

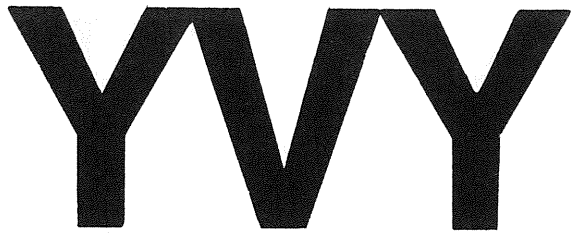
YVY

TUTKIMUS 22

Patogeenisten mikro-organismien määrittäminen kalkkilietteestä

yhdyskuntien vesi- ja ympäristöprojekti

HELSINKI 1976



TUTKIMUS 22

Patogeenisten mikro-organismien määrittäminen kalkkilietteestä

VESIHALLITUKSEN PROJEKTI N:O 7404

KANSANTERVEYSLABORATORION OULUN ALUELABORATORIO
OULUN YLIOPISTON BIOKEMIAN LAITOS

RAILI FORSEN
VELI-MIES HÄIVÄ
LEENA KUIVALAINEN

OULUN YLIOPISTON MIKROBIOLOGIAN LAITOS

PEKKA KORHONEN

yhdyksuntien vesi- ja ympäristöprojekti

HELSINKI 1976

TUTKIMUS 22

WV

neimainopio otilla nelamseepio
äinöitellänön kikkiläitöitöit

Yhteistyössä KIRJAKAUPPA

Yhteistyössä KIRJAKAUPPA

Yhteistyössä KIRJAKAUPPA

Yhteistyössä KIRJAKAUPPA

Yhteistyössä KIRJAKAUPPA

ISBN 951-9250-71-9
ISSN 0355-1997

KYRIIRI OY
Luotsikatu 4, 00160 H:KI 16
PAINO: 90-630 230
MYYNTE: 90-440 211/KIRJAKAUPPA
RUNEBERGINK. 14-16
(H:GIN KAUPPAKORKEAKOULU)
00100 Helsinki 10

ESIPUHE

Yhdyskuntien jätevedenpuhdistamojen lietteen hyödyntämisen esteenä on usein epäily lietteen hygieenisestä laadusta. Liete kelpaa yleensä kuitenkin oikein käytettynä mm. maanviljelykseen ja viher-rakentamiseen (ks. YVY-tutkimus 21 "Jätevesilietteen hyödyntämisen perusteet" sekä ohjekirjanen "Jätevesiliete lannoitteeksi ja maan-parannusaineeksi").

Nyt kyseessä olevan tutkimuksen tavoitteeksi asetettiin selvittää, onko suoralla kalkkisaostuksella toimivan jätevedenpuhdistamon liete hygieeniseltä laadultaan sellaista, että sitä voidaan käyttää pelto-jen ja nurmikoiden lannoitteeksi. Tutkimus alkoi ennen em. YVY-tutkimusta (21) ja sen tulokset ovat muodostaneet erään taustatekijän hyödyntämisohjeita laadittaessa. Tutkimus kohdistuu Oulun kaupungin tuottamaan lietteeseen, joten sen tulokset palvelevat ensi sijassa paikallisia tarpeita.

Tutkimuksen rahoittivat vesihallitus ns. YVY-määrärahasta sekä Oulun kaupunki. Tutkimuksen rahoittamista esittivät ja tutkimuksen suorittivat Oulussa sijaitsevat valtion mikrobiologisen alan laitokset.

Työn kokeellisen osan suorittivat:

- Kansanterveyslaboratorion Oulun aluealaboratorio ja
- Oulun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan mikrobiologian laitos.

Näytteiden otosta ja esikäsittelystä vastasi Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamon käyttöhenkilökunta (dipl.ins. Veikko Möttönen ja teknikko Veli Myllylä).

Tutkimuksen koordinoijana toimi apul.prof. Erkki Pulkkinen Oulun yliopiston kemian laitokselta. Tutkimuksen suorittivat lähinnä seuraavat henkilöt:

dos. Raili Forsén, vastuullisena johtajana (biokemian laitos)
luonnont.kand. Leena Kuivalainen, laboratoriotyöt (biokemian laitos)

luonnont.kand. V-M. Häivä, laboratoriotyöt (biokemian laitos)
lääket.kand. Maire Savijärvi, laboratoriotyöt (Kansanterveys-
laboratorio)

Tutkimusta valvoi vesihallituksesta dipl.ins. Marja-Liisa Poikolainen.

Tutkimus aloitettiin keväällä 1974 ja saatiin valmiiksi helmikuussa 1976.

Tutkimus poikkesi jossain määrin tavoitteesta suuntautuen aiottua enemmän määritysmenetelmien (sekä patogeeniset bakteerit että virukset) kehittämiseen. Sen perusteella voidaan kuitenkin todeta Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamon lietteen sopivan hygieeniseltä kannalta nurmikkojen ja viljakasvien lannoitukseen, kunhan käyttöohjeita noudatetaan.

Yhdyskuntien vesi- ja ympäristöprojekti

SISÄLLYSLUETTELO

	Sivu
ESIPUHE	I
SISÄLLYSLUETTELO	III
ALKULAUSE	V
YHTEENVETO	VI
ENGLISH SUMMARY	IX
1. PATOGEENISA BAKTEEREJA KÄSITTELEVÄ TUTKIMUKSEN OSA	1
1.1 Menetelmien kehittäminen	1
1.1.1 Näytteiden otto	1
1.1.2 Diluentin valinta	2
1.1.3 pH:n säätö	2
1.1.4 Näytteiden homogenointi	2
1.1.5 Salmonellojen rikastusviljely	4
1.1.6 Indikaattoriorganismien osoittaminen	4
1.2 Käytetyt menetelmät	5
1.2.1 Näytteet ja niiden esikäsittely	5
1.2.2 Salmonellojen osoittaminen	7
1.2.3 Fekaalisten streptokokkien ja koliformi- bakteerien osoittaminen	8
1.3 Tulokset	9
1.3.1 Salmonellojen osoittaminen keinotekoisesti infektoiduista näytteistä	9
1.3.2 Kentällä varastoidun lietteen bakteeriston muutoksia	17
1.3.3 Lietenäytteiden bakteriologisia tuloksia aikana tammikuu 1975 - syyskuu 1975	18
1.3.4 Puhdistamattoman jäteveden <u>Salmonella</u> - tutkimuksia	28
1.4 Tulosten tarkastelu	28
2. VIRUKSIA KÄSITTELEVÄ TUTKIMUKSEN OSA	35
2.1 Tutkimusmenetelmien esikokeiden tiivistelmä	35
2.2 Materiaali ja menetelmät	35

	IV
2.2.1 Näytteiden otto ja viljely	35
2.2.2 Näytteiden esikäsittely	36
2.2.3 Virusten eristysmenetelmät	36
2.3 Tulokset	37
2.4 Menetelmien ja tulosten tarkastelua	38
3. OULUN KAUPUNGIN JÄTEVEDENPUHDISTAMON TOIMINTAPERIAATTEET, KÄSITELTY JÄTEVESI JA LIETE	39
3.1 Toimintaperiaate	39
3.2 Jäteveden ja lietteen laadun tarkkailu jäteveden- puhdistamossa	39
KIRJALLISUUS	43
LIITTEET 1...3	

ALKULAUSE

Tällä tutkimuksella pyritään osoittamaan Oulun kaupungin suoralla saostuksella toimivan jätevedenpuhdistamon kalkkilietteen hygieeninen laatu ja lietteen soveltuvuus peltojen ja nurmikoiden lannoitteeksi. Koska tutkimus on tärkeä paikallisesti, pyrkivät Oulussa sijaitsevat mikrobiologisen alan valtion ja yliopiston laitokset toteuttamaan suunnitelman, vaikkakin tiedossa oli tutkimusmateriaalin poikkeuksellisuus ja mm. valmiiden menetelmien puuttuminen.

Työn kokeellisen osan suorituspaikkoina olivat Kansanterveyslaboratorion Oulun aluelaboratorio (KTL) (esimies ylilääkäri E. Herva; patogeeniset bakteerit) sekä Oulun yliopiston lääketieteellisen tiedekunnan mikrobiologian laitos (esimies professori V. Raunio; virologiset tutkimukset, laboraattori P. Korhonen). Tutkimuksen koordinoijana toimi apulaisprofessori E. Pulkkinen (Oulun yliopiston kemian laitos). Työn vastuullisena johtajana oli Oulun yliopiston dosentti Raili Forsén (biokemian laitos).

Oulun kaupungin kemisti, dipl.ins. V. Möttönen, jätevedenpuhdistamon hoitaja, teknikko V. Myllylä sekä jätevedenpuhdistamon käyttölaboratorio osallistuivat näytteiden oton suunnitteluun, vastasivat näytteiden otosta ja esikäsittelystä.

Käytännön laboratoriotyöt aloitti KTL:n vt. apulaislääkäri, lääket. kand. Maire Savijärvi heinäkuussa 1974. Töitä jatkoivat pääosan tutkimuskautta luonnont. kand:t Leena Kuivalainen ja loppukaudella V-M. Häivä (molemmat Oulun yliopiston biokemian laitokselta). KTL:n rutiinityöedellytyksiä käytettiin runsaasti hyväksi koko tutkimuskauden. Virologiset tutkimukset suoritettiin Oulun yliopiston mikrobiologian laitoksen palvelulaboratorion toimesta (laboraattori P. Korhonen).

Allekirjoittaneen virkavapauden aikana on tutkimukseen osallistunut KTL:n vs. kemisti, fil.kand. Maija Leinonen, mikä kiitoksin mainittakoon.

Oulussa, helmikuun 29. päivänä 1976

Raili Forsén

YHTEENVETO

Tässä työssä on tutkittu Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamon kalkkilietteen patogeenisia organismeja. Tarkoituksena on ollut arvioida tämän lietteen soveltuvuus peltojen ja nurmikkojen lannoitteeksi.

(1) Koekauden kuluessa (heinäkuu 1974 - syyskuu 1975) ei ole voitu osoittaa Salmonella-suvun organismeja lietteessä. Indikaattoriorganismien määrät olivat saman suuruisia välittömästi tutkituissa näytteissä kuin kentällä 4 kk:n ajan varastoiduissa lietenäytteissä.

(2) Kokeet keinotekoisesti Salmonella typhimuriumilla infektoiduilla lietenäytteillä osoittivat, että

- (a) salmonellat vähenivät 7 viikossa, mutta niitä voitiin osoittaa vielä 12 viikon säilytyksen jälkeen 17 °C:ssa, jolloin sarjasta löytyi sekä negatiivisia että korkeimman ja alimman salmonellatiheyden näytteitä; tämän syynä on lietteiden epähomogeenisuus useisiin tekijöihin nähden,
- (b) fekaaliset koliformit ja fekaaliset streptokokit alkoivat vähetä samana ajankohtana kuin salmonellat; näiden indikaattoribakteerien väheneminen nopeutui samana ajankohtana, jolloin osa näytteistä oli salmonellattomia,
- (c) alanäytteiden tuloksissa havaitaan hajontaa neljän viikon säilytyksen jälkeen, mihin vaikuttanee lietteen epähomogeenisuus sekä myös pH-tason vaihtelu.

(3) Koska kalkkilietteen fysikaalinen, kemiallinen ja biologinen koostumus häiritsi mikrobien tavanomaisia laboratoriomäärittämiä, jouduttiin koekauden alkuosa (6 kk) käyttämään tähän lietteeseen soveltuvien salmonellojen ja muiden, biologista aktiivisuutta kuvaavien indikaattoribakteerien (fekaaliset koliformit, fekaaliset streptokokit) määrittämismenetelmien kehittämiseen. Koekauden loppuosan (9 kk) aikana tutkittiin yhdeksän näytekerran näytteet (1) välittömästi, (2) yhden vuorokauden ja (3) yhden viikon säilytyksen jälkeen. Lisäksi seurattiin kentälle varastoidun lietteen bakteereja neljäntoista kuukauden aikana.

(4) Jätevedenpuhdistamoon tulevasta jätevedestä otetuista 11 näytteestä eristettiin salmonelloja neljästä näytteestä, jolloin löydettiin seuraavat serotyypit: S. monteideo, S. enteritidis ja S. typhimurium.

Kansanterveyslaboratorion Oulun aluelaboratorion ja Oulun lääninhallituksen sosiaali- ja terveysosaston tilastot (Airas 1976) osoittavat vuosina 1974 ja 1975 S. typhimuriumia 11 tapausta, muita salmonelloja v. 1974 11 ja v. 1975 19 tapausta; S. paratyphi B:tä on todettu molempina vuosina 1 tapaus. Salmonelloosin esiintymistiheyttä Oulun kaupungin alueella on pidettävä tutkimusajankohtana alhaisena, mikä vaikuttaa saatujen lietetutkimusten tuloksiin.

(5) Virustutkimuksen kuluessa (helmikuu 1975 - joulukuu 1975) ei ole voitu osoittaa viruksia lietenäytteistä. Ainoastaan kahdesta käsittelemättömän jäteveden näytteestä on osoitettu tyypittämätön enterovirus.

Oulun yliopiston mikrobiologian laitoksen suorittamat paikallisen yliopistollisen keskussairaalan potilasnäytteiden tutkimukset osoittivat, ettei Oulussa ollut tutkimuksen aikana merkittäviä enterovirusepidemioita.

(6) Kokeet keinotekoisesti Cocksackie B₅- ja Reoviruksilla infektoiduilla näytteillä osoittivat, että

- (a) Cocksackie B₅-virus säilyi elävänä lietteessä yli 14 vrk, kun lietteen pH oli 7,5 tai 10,5,
- (b) Reovirus säilyi sen sijaan vain kaksi vrk elävänä lietteessä, jonka pH oli 10,5, joten
- (c) virusten säilymiseen elävinä lieteolosuhteissa vaikuttavat sekä säilytysolot että viruksen laji.

Johtopäätökset

(1) Koekauden aikana salmonellojen määrä tulevassa jätevedessä oli alhainen, minkä takia niitä ei myöskään voitu osoittaa lietteestä. Indikaattoriorganismien määrät olivat samaa suuruusluokkaa alkupe-
räisessä ja jopa 14 kk säilytetyissä lietteissä. Sen sijaan eri

näytteiden välillä oli eroja indikaattoriorganismien tiheyksien suhteen. 14 kk:n varastoinnin aikana on lietteen pH muuttunut bakteerien säilymiselle edulliseen suuntaan (pH 8,7).

(2) Tulokset salmonelloilla infektoiduilla lietteillä osoittivat näiden organismien alkavan vähetä samoihin aikoihin kuin indikaattoribakteerien eli noin seitsemän viikon säilytyksen jälkeen 17 °C:ssa. Lietteiden epähomogeenisuuden vuoksi määrityksissä oli hajontaa.

(3) Tässä tutkimuksessa saadut tiedot viruksista ovat niukkoja.

(4) Tutkittua lietettä voidaan pitää suoritettujen tutkimusten perusteella nurmikkojen ja viljakasvien käyttökelpoisena lannoitteena, kun käyttöohjelma on hygieeniseltä kannalta valvottu.

(5) Lietetutkimukseen liittyy useanlaisia mikro-organismien toteamiseen vaikuttavia tekijöitä. Tässä on sovellettu työn aikana kehitettyä menetelmää salmonellojen ja indikaattoriorganismien osoittamiseen erikoisesti näytteen esikäsittelyssä. Kuitenkin tarvitaan lisätutkimuksia sekä bakteriologisten että virologisten menetelmien kehittämiseen lietteen tutkimista varten.

SUMMARY

In this study, pathogenic organisms in the lime sludge produced by the waste water purification plant of Oulu town were investigated in order to figure out the suitability of the sludge as fertilizer for fields and lawns.

(1) During the test period of July 1974 to September 1975 no organisms of the genus Salmonella could be found in the sludge. The amounts of indicator organisms were of the same level in samples examined immediately and in samples of sludge that had been stored outdoors for 14 months.

(2) Tests with samples of sludge artificially infected by Salmonella typhimurium indicated that:

- (a) the salmonellas decreased in 7 weeks, but could still be found after storing at 17 °C for 12 weeks: samples at this time included both negative ones and ones with the highest and the lowest salmonella concentration, which is due to the unhomogeneity of sludges in regard to many factors,
- (b) fecal coliforms and fecal streptococci started to decrease at the same time with salmonellas and the decreasing was accelerated at the time when part of the samples were negative in regard to salmonellas,
- (c) dispersion was found in the results of subsamples after storing for 4 weeks, probably due to the unhomogeneity of the sludge and the variation of pH value.

(3) Because the physical, chemical and biological construction of the lime sludge disturbed habitual laboratory determinations, the first part of the test period (6 months) had to be used for developing methods, suited for this sludge, for the determination of salmonellas and other indicator bacteria describing biological activity (fecal coliforms, fecal streptococci). During the rest of

the test period (9 months), samples of nine successive samplings were examined (1) immediately, (2) after storing for one day and (3) after storing for one week. Further, the bacteria of sludge that was stored outdoors were followed during 14 months.

(4) Of the 11 samples that were taken from the intake waste water of the purification plant, salmonellas were isolated from 4 samples and were identified as the following serotypes: Salmonella montevideo, Salmonella enteritidis and Salmonella typhimurium.

The statistics of the Public Health Laboratory of Oulu and the Oulu Provincial Board of Social and Health Affairs (Airas 1976) indicate in the years 1974 and 1975 11 cases of Salmonella typhimurium and 11 cases in 1974 and 19 in 1975 of other salmonellas; 1 case of the Salmonella paratyphi B had been found in both years. The frequency of occurrence of salmonellosis within the area of Oulu town has to be considered low during the test period and this affects the results.

(5) During the virus investigations of February 1975 to December 1975, no viruses could be indicated in the sludge samples. Only in two samples of untreated waste water an unidentified enterovirus could be indicated.

(6) The tests with samples artificially infected by Coxsackie B₅ and Reoviruses showed that:

- (a) Coxsackie B₅ virus survived in sludge for more than 14 days when the pH value of sludge was 7.5 or 10.5,
- (b) Reovirus instead only survived for 2 days in sludge with a pH value of 10.5,
- (c) the survival of viruses in sludge conditions depends on both storing conditions and the type of virus.

Conclusions

- (1) During the test period the amount of salmonellas in the intake waste water was small which also caused that they could not be indicated in the sludge. The amounts of indicator organisms were of the same level in the original sludge and in that after storing for even 14 months. Instead, differences were found between various samples in regard to the concentrations of indicator organisms. During the storage of 14 months the pH value of the sludge had changed in the direction favorable for the survival of bacteria (pH 8.7).
- (2) The results with samples infected by salmonellas indicated that these organisms start to decrease at the same time with indicator bacteria, or after about 7 weeks' storage at 17 °C. Due to the unhomogeneity of the sludge, dispersion was found in the determinations.
- (3) The information gained in this study in regard to viruses is scant.
- (4) The investigated sludge may, based on the results of the tests during that period, be considered suitable for fertilizing lawns and cereals, provided that its application is controlled in regard to the hygiene.
- (5) Various factors connected with the sludge investigations affect the determination of micro-organisms. In this study, a method developed during the course of work was applied in indicating salmonellas and indicator organisms, in particular at the preliminary treatment of samples. Further studies are needed, however, for developing both bacteriological and virological methods for studying sludge.

1. PATOGEENISIA BAKTEEREJA KÄSITTELEVÄ TUTKIMUKSEN OSA

1.1 Menetelmien kehittäminen

Kalkkilietteen ominaisuuksien takia eivät tavanomaiset bakteerien määrittämenetelmät soveltuneet käytettäväksi. Myös lietteen sisältämä polyelektrolyytti häiritsi tavanomaisia määrittämenetelmiä. Täten jouduttiin kehittämään määrittämenetelmiä varsinaisen tutkimuksen ohella. Suoritettujen esikokeiden tulosten tiivistelmässä on pyritty tuomaan lyhyesti esille ne kohteet, joihin on kiinnitetty huomiota. Sen sijaan kyseisiä työvaiheita ei ole kuvattu yksityiskohtaisesti, ja eräät työvaiheet onkin suoritettu vain pistokokeen luontoisina (mm. indikaattoriorganismien osoittaminen eri alustoilla). Useat tiivistelmässä mainitut vaiheet olisivat jo erillisinäkin omia tutkimusaiheitansa. Työn kuluessa kehitetty lietenäytteiden käsittelymenetelmä selostetaan osassa 1.2.

1.1.1 Näytteiden otto (koekerran näytelukumäärä ja näytteen paino) (Parkinson et al. 1971)

- 1) Näytteenottokohde kaaviossa 3, kohde 3 s.40.
Rinnakkaisnäytteiden lukumäärä viittä koekertaa kohti.
Jokainen näyte koostuu viidestä alanäytteestä á 20 g.
Koekerralla saadaan tutkittavaksi lietettä yhteensä 500 g.

Neljän koekerran havainnot osoittivat, että näytemäärää on vaikea käsitellä käytettävissä olleissa laboratorio-olosuhteissa ja varastun työperiodin aikana.

- 2) Lääketieteellisen tiedekunnan teknisen jaoston kanssa suunniteltiin lieriömäinen näytteenottoväline, jolla saadaan 25 g:n näyte hihnakuljettimen nauhalta (kaavio 3, kohde 3). Jokainen tutkittava näyte koostuu kahdesta, yhteensä 50 g:n alanäytteestä (liite 1). Näytteiden lukumäärä esitutkimuksissa koekertaa kohti on 3 - 6, koekertoja on 7.

- 3) Kentällä varastoidun lietteen näytteet otettiin mainitun jaos-

ton suunnitteleamalla kairalla. Näyte (50 g) edusti lietekasan neljää eri syvyyttä (liite 2).

1.1.2 Diluentin valinta

1) Nesteenä fysiologinen keittosuolaliuos, suspensio 1/1 (koekerrat 1 - 4)

2) Nesteenä " " suspensio 1/2, vaihtoehtoisesti Teepol S 14-L 0,7 % (työn myöhemmät vaiheet) (Seppänen 1973).

Kummallakin nesteellä saatiin samansuuntaiset tulokset käytettäessä 50 g näytettä ja 100 ml nestettä.

1.1.3 pH:n säätö

1) Käyttäen 1 N H_2SO_4 :ta säädettiin pH 7:ään (7,0 - 7,5).

2) " " " " pH 9:ään (9,0 - 9,5)

pH 7 oli edullisempi sekä bakteerikasvun tuloksille että bakteerien irtoamiselle. Sen sijaan HCl:n tai H_2SO_4 :n käytöllä ei havaittu eroja.

1.1.4 Näytteiden homogenointi

Vaihe 1. Näyte (50 g) on otettu kannelliseen standardimuovitölkkiin (1/2 l) ja siihen on lisätty neste (100 ml) sekä lasihelmiä. Näyte on neutraloitu (pH 7) sekoittaen samalla magneettisekoittajalla ja

- homogenoitu ravistelulaitteessa (Bühler B/SM 2), jonka nopeus on keskimäärin 140 ravistelua/min
- kokeillut ravisteluajat ovat 30, 40 ja 60 min; näistä 60 min valittiin lopulliseksi.

Vaihe 2. Edellä saadun näytesuspension käsittelyssä verrattiin kolmea eri menetelmää.

1) Seisotus 30, 40 tai 60 min. Samea nesteosa on käytetty joko sellaisenaan tai konsentroidu piimaasuodatuksella. Laskeutunut osa on tutkittu sellaisenaan.

2) Sentrifugointi ja sen tavoite:

- ensimmäisessä käsittelyssä poistetaan karkein ainesosa, joka heitetään pois (sedimentti A),
- toisessa käsittelyssä saadaan solut ja sen ohella muuta sedimenttiä vähäinen määrä (sedimentti B) sekä supernatantti B.

a) Sentrifugoinnin kokeillut vaihtoehdot:

- 500 rpm 15 min (IEC B-20 sentrifugi)
- 800 " "
- 1 000 " "
- 3 300 " "
- 6 000 " "
- 8 000 " " ; käytetty joko yhtä tai kahta sentrifugointia yhdistelmänä.

b) Esimerkki sentrifugoinnista 1 000 rpm 15 min (A) ja 3 300 rpm 15 min (B):

- sedimentti A, jossa "pintasedimentti" ohut, öljymäinen, "välisedimentti" tumma, hienojakoinen, sitkeä, "pohjasedimentti" karkea, hiekkamainen,
- sedimentti B ja supernatantti B edellisestä supernatantista.

c) Esimerkki saatujen fraktioiden bakteeritiheyksistä näytteessä 9.7.1974:

- sedimentti A sisältää 15 000 kolif./g = 150 000 kpl/näyte
 - sedimentti B " 2 400 " /g = 2 400 "
 - supernatantti B " 230 " /ml 23 000 "
- näytteessä yhteensä 175 400 kolif./100 g
näytteessä ei salmonelloja.

Jos näytettä pelkästään seisotetaan (vaihe 2.1), tapahtuu liian heikko erottuminen. Sentrifugoitaessa (vaihe 2.2) sedimenttiosaan joutuu yhdessä karkean hiekkamaisen aineen kanssa merkittävästi bakteereja. Öljymäinen ja sitkeä osa vaikeuttavat sedimentin käsittelyä ja tulosten toistettavuutta. Sedimentti sisältää myös bakteerien kasvulle toksisia (inhibitorisia) aineita, joten sentrifugoinnista luovuttiin.

3) Modifikaation ensimmäinen homogenointivaihe tapahtui kuten edellä (vaihe 1), mutta sen jälkeen käytettiin hyväksi suspension selkeytystä seisottamalla, sifonointia sekä kahta uutta ravistelukertaa. Menetelmä selostetaan myöhemmin s. 7.

1.1.5 Salmonellojen rikastusviljely

- 1) Kalvosuodatus ei soveltunut samealle, partikkeleita sisältävälle nesteelle.
- 2) Piimaasuodatus oli konsentroidintimenetelmänä käyttökelpoinen:
 - rikastusviljely: seleniittiliemi (Orion) ja kasvatusaika 1 vrk ja 2 vrk,
 - kasvatuslämpötila 37 °C ja 41,5 °C jälkimmäisen jäädessä lopulliseen käyttöön,
 - näytteen määrät kasvatuskolveissa vastaavat lietemääriä 100 g, 50 g, 25 g, 12,5 g, 2,5 g ja 1 g. Sarjalla pyrittiin eliminoimaan inhibitoristen tekijöiden vaikutus ja saamaan MPN-menetelmään laimennussarja semikvantitatiivisia tuloksia varten.

1.1.6 Indikaattoriorganismien osoittaminen

- 1) Kalvosuodatus ei soveltunut laimennetullekaan näyte-erälle. Mahdollisesti toksisia partikkeleita konsentroituu kalvolle:
 - pistokokeina Endo-, EMB- ja MFC- sekä Slanetzin alustat, tulokset eivät olleet toistettavia.
- 2) MPN-menetelmä soveltui nestefaasille edellyttäen, ettei se si-

sältänyt sedimenttikontaminaatiota.

- Koliformit tutkittiin laktoosilihaliemiputkissa (3 x 5) (37 °C ja 44,5 °C), jolloin laaja laimennussarja oli tarpeellinen; sen vuoksi rajoituttiin työn myöhemmässä vaiheessa vain fekaalisiin organismeihin.
- Fekaaliset koliformibakteerit tutkittiin MacConceyn liemessä (Difco) 3 x 3 putken sarjassa.
- Fekaaliset streptokokit tutkittiin SF-liemessä (Difco), 3 x 3 putken sarjassa.

Fekaalisten organismien ryhmät valittiin indikaattoriorganismeiksi. Näytteiden käsittelyvaiheiden nestetilavuudet suunniteltiin sellaisiksi, että tilastollisten taulukoiden käyttö oli mahdollista vrt. s. 8.

Sedimentin A väli- ja pintaosat sisälsivät bakteerikasvua estäviä tekijöitä. Työn aikana kehitetyn selkeytys-, sifonointi- ja ravistelumenetelmän avulla pyrittiin varmistamaan, että mahdollisimman suuri organismimäärä saatiin nestefaasiin, joka otettiin lopulliseksi tutkimuskohteeksi.

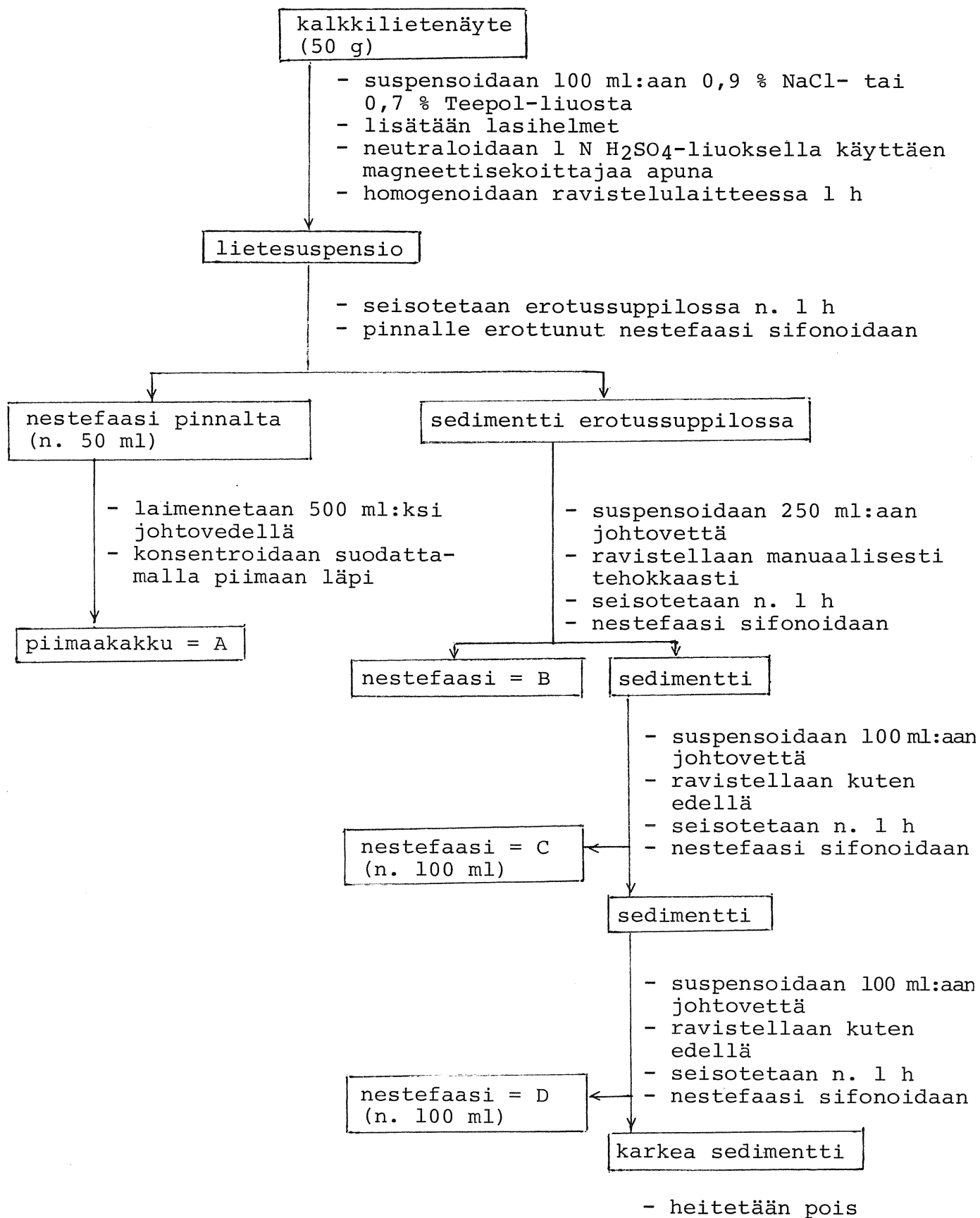
1.2 Käytetyt menetelmät

1.2.1 Näytteet ja niiden esikäsittely

1) Näytteenotto järjestettiin siten, että näytesarja (6 näytettä) otettiin standardimuovitölkkeihin (1/2 l) hihnakuljettimen nauhalta (kaavio 3, näytteenottokohde 3 s. 40). Esikäsittelyn alkuvaiheet suoritettiin näytteenottotölkissä. Näytteenottolomake on liitteenä 3.

Jokainen näyte sisälsi kaksi alanäytettä á 25 g, yhteensä 50 g. Kullakin koekerralla tutkittiin kaksi rinnakkaisnäytettä. Jokainen koesarja sisälsi kolme koekertaa, joista

1. näytteenottopäivänä,
2. 1 vrk säilytyksen jälkeen (10 °C) ja
3. 1 viikon säilytyksen jälkeen (10 °C).



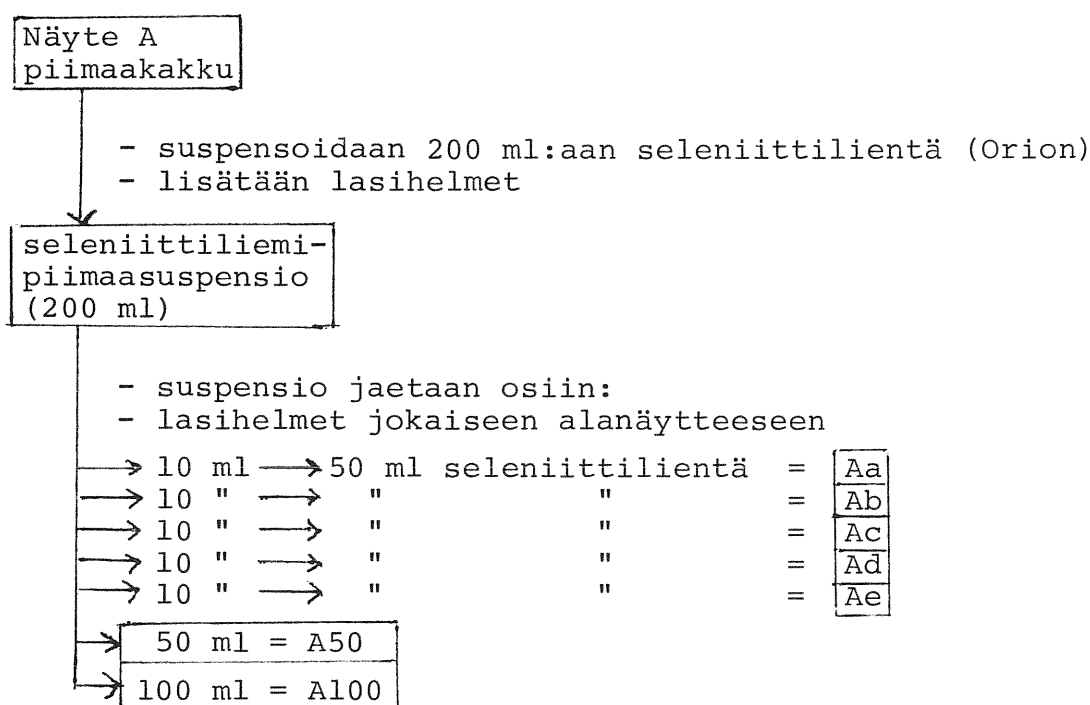
Kaavio 1. Kalkkilietenäytteen esikäsittely.

2) Näytteiden esikäsittely on esitetty kaaviossa 1.

Sifonointi aloitetaan Millipore-käsiruiskun avulla (XX62 000 05) ja loput nesteestä saadaan yhtyvien astioiden periaatteella. Piimaasuodatusta varten Millipore-suodatuslaitteiston suppilon kaulaosa täytetään steriilillä piimaalla ("Celite"). Alustana on esisuodatuskiekko tai elatusaineen absorbointiin tarkoitettu "absorbent pad".

1.2.2 Salmonellojen osoittaminen

Salmonellat osoitettiin semikvantitatiivisesti. Erotettujen liete-näyteosien käsittely jatkotutkimuksissa salmonellarikastuksissa on esitetty kaaviossa 2.



Kaavio 2. Kalkkilietteen näyteosan (A) jatkotutkimus: salmonellojen seleniittiliemirikastus.

1) Näytteen jakaminen alanäytteiksi ja laimennussarjaksi, josta 1 x 50 ml:n ja 5 x 10 ml:n tuloksia voidaan käyttää semikvantitatiivisesti MPN-indeksin avulla on suoritettu Burman'in (1967) esit-

tämällä tavalla.

Näyteosat B, C ja D (kaavio 1) eivät sisältäneet salmonelloja keitekoisesta infektoituja näytteitä tutkittaessa, joten keskityttiin näyteosa A:n tutkimiseen. Näyteosista B, C ja D otettiin kuitenkin pistokokeita salmonellojen osoittamiseksi siten, että sedimenteistä tehtiin viljely S-S-maljalle.

2) Seleniittiliemirikastuskolveja kasvatettiin 1 vrk 41,5 °C:ssa, ja viljeltiin S-S-maljoille (Orion) kertakäyttölasisauvalla. Jokaisen tutkitun näytteen alanäytteiden sarjan kolmesta tai neljästä rikastekolvista viljeltiin myös Drigalskin laktoosimaljat, jotta olisi saatu yleiskuva näytteen bakteerien määrästä. Maljaviljelyt toistettiin myös 2 vrk:n seleniittiliemirikastuksen jälkeen. S-S-maljoja inkuboitettiin 37 °C:ssa.

3) Tulokset luettiin S-S-maljoilta 1 ja 2 vrk:n inkuboinnin jälkeen. Salmonelloiksi epäillyt pesäkkeet siirrostettiin ureaputkiin, TSI-putkiin ja positiivisista putkista tehtiin jatkotutkimukset (Edwards & Ewing 1961). Bakteerien lukumäärä laskettiin MPN-indeksin ja positiivisten 50 ml:n kolvin ja 5 x 10 ml koeputkien tulosten perusteella (WHO 1963).

Vesinäytteet (jätevedenpuhdistamon tuleva vesi) (2 l) konsentroidiin ensin piimaasuodatuksella. Piimaakakun käsittely tapahtui saman periaatteen mukaan kuin näytteessä A.

1.2.3 Fekaalisten streptokokkien ja koliformibakteerien osoittaminen

Fekaalisten streptokokkien ja koliformien määrää seurattiin näyteosista B, C ja D. B- ja C-näytteiden tulokset kuvasivat samalla 1 vrk:n ja 1 viikon säilytyksen vaikutusta näiden bakteerien määriin kalkkilietteessä. D-näytteiden negatiiviset tulokset osoittivat esikäsittelyvaiheiden olleen riittäviä.

Näyte B (kaavio 1) laimennetaan fosfaattipuskurilla 1/100. Pipetoi-

daan 3+3+3 putkisarjat SF-liemeen (Difco) fekaalisten streptokokkien osoittamiseksi ja vastaavasti MacConcey-liemeen (Difco) fekaalisten koliformien osoittamiseksi. Pipetoidut näytemäärät ovat 10 ml, 1 ml ja 0,1 ml.

SF-putkisarja kasvatetaan 37 °C:ssa 1 vrk ja MacConcey-putkisarja 44,5 °C:ssa 1 vrk. Tulokset saadaan tavalliseen tapaan MPN-indeksin avulla.

Näyte C:stä pipetoidaan laimennokset suoraan SF- ja MacConcey-putkiin.

Näyte D:stä siirrostetaan suoraan EMB-maljalle 0,1 - 0,2 ml näytettä ja kasvatetaan 1 - 2 vrk 37 °C:ssa.

1.3 Tulokset

1.3.1 Salmonellojen osoittaminen keinotekoisesti infektoiduista näytteistä

Sarjoissa 1 ja 2 on pyritty osoittamaan koeorganismien säilyminen elävinä tai kuoleminen käytetyissä koeolosuhteissa. Samalla on kiinnitetty huomiota käytetyn koetekniikan parantamismahdollisuuksiin. Toisella koekerralla on parannettu koetekniikkaa siten, että näyte seleniittiliemirikastuksessa on homogenoitu ensin ravistelulaitteella. Sarjassa 3 on pyritty määrittämään salmonellat semikvantitatiivisesti.

Koesarja 1.

Lietenäytteet otettiin jätevedenpuhdistamolta hihnakuljettimen nauhalta suoraan koeputkiin, 10 kpl á n. 2 g, putket n:o 1 - 10. Sarja alkoi 16.7.1974.

Infektointi suoritettiin keinotekoisesti KTL:n kokoelmakannalla Salmonella typhimurium. Organismia kasvatettiin ensin maljaviljel-

mänä, josta siirrostettiin yksi pesäke platinalangalla jokaista näyteputkea kohti mahdollisimman tasaiseksi suspensioksi lietteeseen.

Siirrosta säilytettiin huoneenlämmössä pimeässä. Säilytysaika määräytyi positiivisten tulosten mukaan ja pyrittiin viikottaisiin viljelyihin.

Salmonellojen osoittaminen tapahtui kahdesta rinnakkaisputkesta:

- jokaisen koeputken näyte-erä vietiin seleniittiliemikolviin (100 ml)
- pH tarkistettiin 7:ksi, näyte rikastettiin normaalisti ja
- jatkotutkimukset tehtiin normaaliin tapaan.

Tiivistelmä tuloksista ilmenee seuraavasta asetelmasta:

säilytysaika vrk	putken n:o	tulos + tai -
7	1 ja 2	- ja -
9	3 ja 4	- ja +
10	5 ja 6	- ja +
14	7 ja 8	- ja +
"	9 ja 10	- ja +

Sarja 1:n tulokset osoittivat koeorganismin voivan säilyä käytetyissä koeolosuhteissa ainakin kaksi viikkoa. Toisaalta negatiivisissa S-S-maljoissa sekä Drigalskin laktoosimaljoissa havaittiin paitsi koeorganismin kasvun estyneen, myös muiden alkuperäisten seuralais-organismien kuten koliformien kasvun täysin estyneen.

Saatiin neljä positiivista viljelytulosta kymmentä tutkittua näytettä kohti: toinen rinnakkaisnäyte oli aina negatiivinen. Tämä osoittaa, että vaikka käytetään samaa infektoimis- ja tutkimusmenetelmää, näyte-erät sisältävät toksisia tai inhibitorisia tekijöitä, jotka vaikuttavat yleensä bakteerien säilymiseen elävinä lietteessä.

Koesarja 2.

Lietenäytteet otettiin jätevedenpuhdistamolta hihnakuljettimen nauhalta suoraan koeputkiin á noin 2 g, putket n:o 1 - 20. Sarja alkoi 20.8.1974.

Näytteet infektoitiin kuten 1. sarjassa; sarjan kaksi ensimmäistä putkea kontrolleina ilman keinotekoista infektiota.

Säilytys tapahtui kuten 1. sarjassa.

Salmonellan osoittamisen koemenetelmä varmistettiin kontrolliputkista (n:ot 1 ja 2 sekä 3, 4, 5 ja 6) siten, että putket 1 ja 2 tutkittiin ennen infektoimista ja 3 - 6 heti infektoinnin jälkeen ilman säilytyksen vaikutusta. Näin pyrittiin selvittämään lietteen välitön toksinen vaikutus koemenetelmän luotettavuuteen. Rikasteliuoskolvi näytteineen ravisteltiin huolella ravistelulaitteessa näytteen homogenoimiseksi sekä pH:n tarkistamista ja korjaamista varten (pH 7,0). Kasvatus- ja osoittamisolosuhteet olivat normaalit.

Tulosten tiivistelmä on seuraavassa asetelmassa.

<u>säilytysaika</u>	<u>putken n:o</u>	<u>tulos + tai -</u>
alkuper. näyte	1 ja 2	- ja -
" , jossa infekt.	3, 4, 5 ja 6	+, +, + ja +
- välittömästi		
3 vrk	7, 8, 9 ja 10	+, +, + ja +
7 vrk	11, 12, 13 ja 14	+, +, + ja +
14 vrk	15, 16 ja 17	+, + ja +
3 viikkoa	18, 19 ja 20	+, + ja +

Sarja 2:n tulokset osoittavat koeorganismien säilyvän elävinä ainakin kolme viikkoa. Kahden rinnakkaisnäytteen koetulokset ovat yhtäpitäviä, mikä johtuu osaltaan näytteen aikaisempaa perusteellisemmasta homogeenoinnista, mutta kyseessä voi myös olla homogeenisempi aineisto kuin 1. sarjan alanäytteissä.

Koesarja 3.

Lietenäytteet otettiin jätevedenpuhdistamolta hihnakuljettimen nauhalta suoraan muovisiin kierretulppaisiin näytteenottotölkkeihin (Sterilin, tilavuus 25 ml). Näytteen paino oli 2 g. Koesarjaa varten varattiin 40 näytetölkkiä. Sarja alkoi 13.5.1975.

Infektointi keinotekoisesti tapahtui samalla Salmonella-kannalla kuin 1. ja 2. sarjoissa. Valmistettiin ensin salmonellasuspensio, jonka bakteeritiheys oli maljaviljelyn avulla osoitettuna 8×10^7 kpl/ml. Kunkin näytesarjan näytteet n:ot 1 ja 2 sisälsivät 0,2 ml suspensiota, näytteet n:ot 3 ja 4 0,1 ml suspensiota.

Säilytys tapahtui 17 °C lämpökaapissa. Pyrittiin viikottaisiin viljelyihin.

Salmonella osoitettiin neljästä rinnakkaistölkistä (n:ot 1 - 4), kahdesti kahdesta rinnakkaistölkistä (n:o 1 - 2):

- Jokainen näytetölkki otettiin kerralla tutkittavaksi ja esikäsiteltiin tutkimuksen aikana kehitetyn lopullisen esikäsitteilyohjeen mukaan (ks. s. 6).
- Salmonellaorganismien lisäksi seurattiin fekaalisten koliformien ja fekaalisten streptokokkien määrien muutoksia em. ohjeen mukaisesti.
- Sen lisäksi merkittiin muistiin havainnot Drigalskin laktoosimaljoista, jotka viljeltiin rinnan S-S-maljojen kanssa. Kasvua kuvattiin 1 vrk:n kasvatusajan jälkeen + - +++ merkinnoilla.

Tutkimukset käsittävät 11 koekertaa, joiden tuloksia on esitetty taulukossa 1.

1) Salmonella-määrän ollessa yli 16 bakteeria/näyte saadaan rinnakkaisista näytteistä saman suuruusluokan tulokset. Säilytysajan pidentyessä rinnakkaisnäytteiden tulokset poikkeavat toisistaan. Suurin poikkeama neljän näytteen tuloksissa saatiin viimeisellä koekerralla, so. 12 viikon säilytyksen jälkeen, jolloin osoitettiin koesarjan suurin ja pienin tulos (>16 ja 0 bakteeria/näyte). Kas-

Taulukko 1. Salmonella-koetulokset (koesarja 3) sekä suhteellinen kasvu Drigalskin laktoosimaljoilla (1 vrk:n kasvatusaika). Infektoidut näytteet säilytetty 12 viikon ajan 17 °C lämpökaapissa. Näytteiden esikäsittely vastaa lietenäytteiden käsittelyä tutkimuksen jälkimmäisessä osassa, s. 6.

Säilytys, viikkoa	Näyte n:o	Positiivisten rikastekolvien lukumäärä					Kasvu Drigalskin laktoosimaljalla	
		1x100 ml	1x50 ml	5x10 ml	MPN-indeksi ^{x)}			
alkuper. (13.5.1975)	1-4	1	-	1	-	5	> 16	+++
1	1-4	1	-	1	-	5	> 16	+++
2	1-4	1	-	1	-	5	> 16	+++
3	1-4	1	-	1	-	5	> 16	+++
4	1-3	1	-	1	-	5	> 16	+++
	4	1	-	1	-	3	9	+++
5	1-4	1	-	1	-	5	> 16	+++
6	1	1	-	1	-	5	> 16	+++
	2	1	-	1	-	2	6	+++
7	1-2	1	-	0	-	1	1	+++
	3	1	-	1	-	3	9	++
	4	1	-	1	-	4	16	++
9	1	1	-	1	-	4	16	+++
	2	1	-	1	-	1	3	++
	3-4	1	-	1	-	5	> 16	+++
10	1	0	-	0	-	0	0	+
	2	1	-	1	-	2	6	++
12	1-2	0	-	0	-	0	0	++
	3	1	-	1	-	5	> 16	+++
	4	1	-	1	-	0	2	++

- yhteensä 40 näytettä, ä 2 g
- siirrostuksessa käytetty Salmonella-määrä: 0,1 tai 0,2 ml suspensiota, joka sisälsi organismeja 8×10^7 kpm/ml. Näytteisiin 1 ja 2 lisäys 0,2 ml, näytteisiin 3 ja 4 0,1 ml.

x) International standards for drinking-water. WHO. Geneva 1963. s. 51.

vu Drigalskin laktoosimaljassa oli heikompaa samanaikaisesti, kun myös salmonellamäärät alkoivat vähentyä.

Taulukossa 2 on esitetty Salmonella-malliviljelmien säilytyskoesarjan yhteenveto. Näytteet on ryhmitetty salmonellatiheyden mukaan ryhmiin I-IV. Näiden ryhmien näytteet sijoittuvat eri koe-kertoihin piirroksen 1 osoittamien prosentuaalisten osuuksien mukaisesti. Salmonella-negatiivisia näytteitä (3 näytettä) on säilytetty 10 ja 12 viikkoa, mutta ne käsittävät vain 50 % kyseisinä ajankohtina tutkituista näytteistä. Tutkimuksen tavoitteen kannalta epäedullisin on sen näytteen tulos, jossa 12 viikon säilytyksen jälkeen löytyy salmonellaorganismeja kaikista laimennossarjan viljelykolveista (>16 kpl/näyte).

Taulukko 2. Salmonella-malliviljelmien 3. koesarjan yhteenveto.

Ryhmä	<u>Salmonella-</u> tiheys/2 g	Näytteiden lukumäärä	Säilytys, viikkoa (= 11 koekertaa)											
			A	1	2	3	4	5	6 ^x	7	9	10 ^x	12	
I	>16	27	4	4	4	4	3	4	1		2		1	
II	9 - 16	4					1			2	1			
III	1 - 8	6							1	2	1	1	1	
IV	0	3										1	2	
Yhteensä		40	4	4	4	4	4	4	2	4	4	2	4	

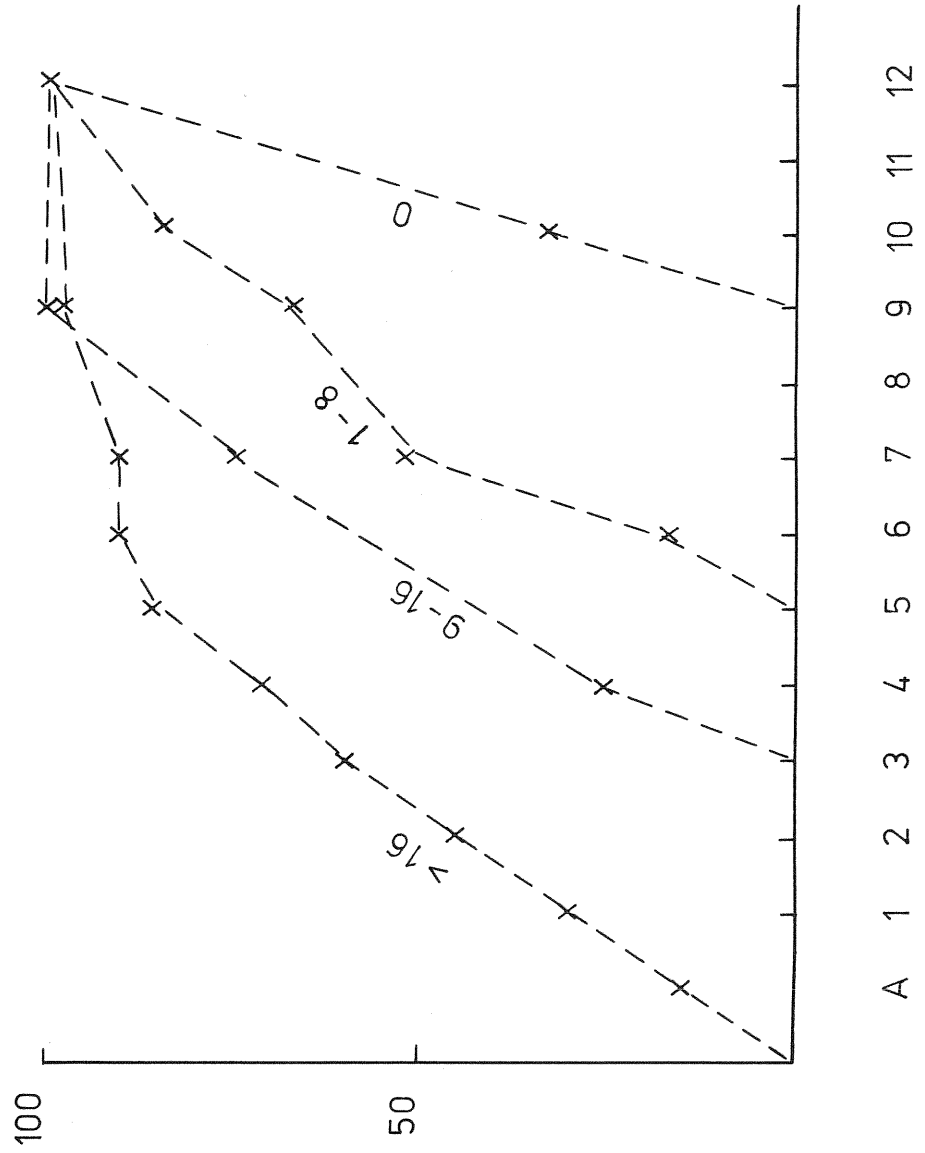
x) 2 rinnakkaista näytettä; kaikissa muissa 4

A = alkuperäinen näyte

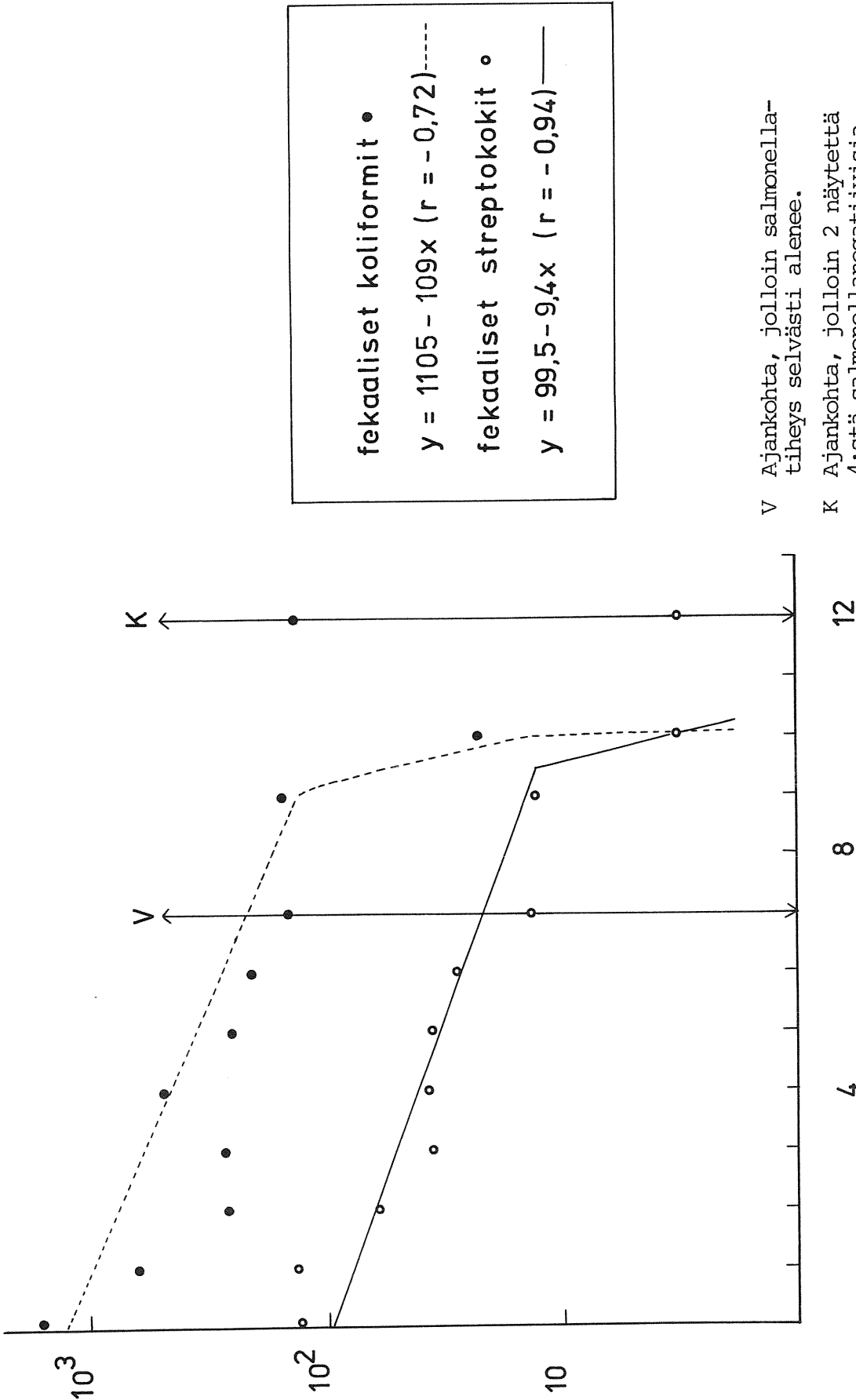
Piirroksesta 1 havaitaan myös, että säilytysajan alussa (kolmen viikon kuluessa) saadaan neljästä rinnakkaisesta näytteestä käytetyllä menetelmällä samanlaiset tulokset. Neljän viikon säilytysajan jälkeen alkaa tapahtua hajontaa rinnakkaisten näytteiden tuloksissa.

2) Fekaalisten koliformien ja fekaalisten streptokokkien määrien muutokset bakteerimäärien ja säilytysajan välisenä korrelaationa on esitetty piirroksessa 2. Bakteerilukumäärät ovat peräisin esikäsittelyvaiheista B ja C (s. 6) ja tulokset on esitetty neljän (kahden)

KUMULATIIVINEN FREKVENSSI (NÄYTEMÄÄRÄT %:NA)



Piirros 1. Neljän Salmonella-tiheysryhmän näytteiden prosentuaalinen jakaantuminen 12 viikon koeauden aikana. (Ryhmät: >16, 9-16, 1-8 ja 0 pesäkettä/2 g lietettä).



V Ajankohta, jolloin salmonella-tiheys selvästi alenee.

K Ajankohta, jolloin 2 näytettä 4:stä salmonellanegatiivisia ja 1 näyte >16 sekä 1 näyte 2 pesäketä.

SÄILYTYSAIKA VIIKKOA

Piirros 2. Lietenäytteen fekaalisten koliformien ja fekaalisten streptokokkien tiheyden korrelaatio säilytysaikaan.

näytteen tulosten keskiarvoina. Indikaattoriorganismien määrissä havaitaan muutos samana ajankohtana, jolloin salmonellatiheys selvästi alenee näytteissä (seitsemän viikon säilytys). Säilytysajan lopussa (12 viikkoa) ovat kummatkin indikaattoriorganismiryhmät vähäisiä. Fekaalisten koliformien määrä on selvästi suurempi (suuruusluokka 100 kpl/näyte) kuin fekaalisten streptokokkien määrä (suuruusluokka ≤ 5 kpl/näyte).

Työssä käytetyn koejärjestelyn perusteella ei voida laskea kyseisten bakteeriryhmien prosentuaalista vähenemistä alkuperäisestä 100 %:sta. Käytössä olleen työperiodin vuoksi keskitettiin vertailu saman esikäsittelyn määrättyihin näyteosiin.

1.3.2 Kentällä varastoidun lietteen bakteeriston muutoksia

Jätevedenpuhdistamossa 9.7.1974 muodostunutta kalkkilietettä tutkittiin koekauden aikana seuraavasti, koekerrat 1 - 6:

1. alkuperäinen liete;	keskikesä 1974
2. 2 viikkoa varastoitu liete	" "
3. 7 " " "	syksy 1974
4. 4,5 kk " "	talvi 1974-75
5. 11 " " "	kevät 1975
6. 1 v 2 kk " "	syksy 1975

Tutkimuksessa määriteltiin 1) Salmonella-organismit jokaisella koekerralla 2 - 6 rinnakkaisesta näytteestä ja 2) selvitettiin näytteiden biologista aktiivisuutta siten, että 1. ja 2. kerroilla määritettiin yleensä koliformit ja 3. - 6. kerroilla tutkimuksen fekaaliset indikaattoriorganismit. Yhteensä tutkittiin 12 näytettä, joista 3) seurattiin pH:n muutoksia varastoinnin aikana.

Tuloksia

- 1) Salmonella: Kaikki näytteet olivat salmonellanegatiivisia.
- Koliformit: 1. koekerta 175 000 /100 g kalkkilietettä
2. " 387 000 /100 g ja 487 900 /100 g

Fekaaliset koliformit:

3.	koekerta	7 581 ja 4 640	/50 g
4.	"	5 500 ja 3 500	/50 g
5.	"	9 100; 2 710; 8 655	/50 g
6.	"	750 ja 2 250	/50 g

Fekaaliset streptokokit:

3.	koekerta	2 527 ja 1 856	/50 g
4.	"	2 060 ja 1 100	/50 g
5.	"	8 016; 1 016; 1 016	/50 g
6.	"	11 000 ja 990	/50 g

3) pH:n muutokset lietettä varastoitaessa:

1.	koekerta	10,3
2.	"	9,1
3.	"	10,4
4.	"	9,0
5.	"	8,8
6.	"	8,7

Tuloksista ei voi havaita suoraa varastointiajan vaikutusta tutkittujen bakteeriryhmien vähenemiseen, sillä myös saman koekerran rinnakkaisnäytteet vaihtelivat huomattavasti. Syksyn koekerran bakteeritaso ei ole vähentynyt selvästi talven aikana. Tämän syynä on kylmyyden säilyttävän vaikutuksen lisäksi myös pH:n muutos bakteerien säilymiselle edulliseen suuntaan.

Varastointisarjassa tutkittiin yhteensä 600 g kalkkilietettä samasta jätevedenkäsittelyerästä eikä salmonelloja tällöin löydetty.

1.3.3 Lietenäytteiden bakteriologisia tuloksia aikana tammikuu 1975 - syyskuu 1975

1) Salmonellojen osoittaminen

Kaikki tutkitut näytteet käytettäessä edellä kuvattua näytteiden esikäsittelyä olivat salmonellattomia.

Tulosten luotettavuuden tarkastelua

a) Koekerrat ja näytemäärät sekä viljelyjärjestelyt on eritelty seuraavassa asetelmassa:

- Koekertoja: 9
- Näytteitä: 9 x 2 rinnakkaista: alkuperäiset näytteet
 - 9 x 2 " : 1 vrk säilytet "
 - 9 x 2 " : 1 viikko " "
 - yhteensä tutkittu 54 näytettä
 - " " 2 700 g lietettä
- Salmonellojen osoittamiseksi suoritettu:
 - seleniittirikastuksia 54 x 7 kolvia = 378,
 - S-S-maljoja viljelty 2 x 378 maljaa = 756 ja
 - jatkotutkimuksina viljelty
 - tsia-putkia 153 kpl, joista 24 positiivisia
 - urea-putkia " "
 - sokerisarjoja 24 kpl (kaikki salmonellatto-
 - mia)
 - agglutinaatio-testejä tarvittu 4 kpl (kaikki
 - salmonellattomia).

b) Keinotekoisesti infektoiduista lietenäytteistä on voitu osoittaa salmonellat tällä menetelmällä. Käytettävissä ei kuitenkaan ole ollut tulossarjaa, joka osoittaisi menetelmän herkkyyden. Keinotekoisessa infektoinnissa käytettiin runsasta solumäärää ja voitiin osoittaa solujen säilyvän elävinä ainakin 12 viikkoa.

c) Osassa 1.3.4 esitetään jätevedenpuhdistamon tulevan jäteveden Salmonella-tutkimuksen tuloksia; ko. salmonellapitoisuus ratkaisee lietteen salmonellariskin.

- 2) Lietenäytteiden biologinen aktiivisuus;
indikaattoriorganismeina fekaaliset koliformit ja fekaaliset streptokokit:

Tutkimuksessa seurattiin lietteen käsittelyvaiheiden B ja C bakteeritiheyksiä alkuperäisissä, 1 vrk ja 1 viikon säilytetyissä näytteissä.

Koesarjan yhteenveto on esitetty taulukossa 3 ja 4. Fekaalisten koliformien sekä streptokokkien tasot keskiarvoina ja vaihtelu-
rajojen perusteella ovat samat alkuperäisissä ja 1 viikon säily-
tetyissä näytteissä. Yhden vrk säilytyksen jälkeen suuruusluokka
on alhaisempi korkeamman bakteeripitoisuuden sarjassa. Tämä voisi
kuvastaa näytteiden sisältävän toksisia ja inhibitorisia tekijöitä,
joiden vuorovaikutus vähenee tai häviää säilytyksen jatkuessa. Tä-
hän viittaisi myös 3. ravistelukerran (C) tulokset, joissa tapahtuu
vähennemistä säilytyksen jatkuessa. Ilmiö on selvin tarkasteltaessa
koesarjan tulosten keskiarvoa. Myös viljelyn yhteydessä on kiinni-
tetty huomiota sedimentin sisältämiin bakteerien kasvua estäviin
tekijöihin, johon perustui näytteiden käsittelysarja, vaiheet A,
B ja C.

Alkuperäisissä näytteissä havaitut bakteerien tiheyksien vaihtelut
ilmenevät piirroksessa 3. Kahden lähikuukauden (II ja III) näyt-
teiden tulosten ero on samaa suuruusluokkaa kuin koko kauden ku-
luessa todettu vaihtelu. Kuitenkin keskimäärin alhaisimmat tulok-
set on saatu kevät-kesäkaudella.

Fekaalisten koliformien (FC) ja fekaalisten streptokokkien (FS) vä-
listä suhdetta verrattaessa havaitaan alkuperäisten näytteiden pää-
osan, taulukko 5, olevan yli 0,7 (vaihe B) ja samansuuntaisesti
vaiheessa C (taulukko 6). Työssä tutkituista alkuperäisistä näyt-
teistä 14 % antoi suhteen $<0,7$, mikä on tutkitulle materiaalille
sopimaton (Geldreich et al. 1964). Luku kuvanee ko. organismien
irrottamisessa olevia vaikeuksia.

Säilytettyjen näytteiden (1 vrk ja 1 viikko) kyseisten bakteerien
tiheyksien vaihtelut ilmenevät alkuperäisten tiheyksien rinnalla
piirroksista 4 ja 5, vaiheet B ja C. Puolet 1 vrk ja 1 viikon
säilytetyistä näytteistä sisältää 5 000 - 5 800 fekaalista kolifor-
mia (vaihe B). Alkuperäisistä näytteistä 67 - 83 % kuuluu tähän
tasoon.

89 % alkuperäisistä ja viikon säilytetyistä näytteistä sisältää
saman fekaalisten streptokokkien tiheyden, 5 800, kuin 96 % vrk:n
säilytetyistä näytteistä.

Taulukko 3. Alkuperäisestä, yksi vuorokausi ja yksi viikko säilytetyistä lietenäytteistä toisen ja kolmannen ravistelun jälkeen irronneiden fekaalisten koliformien määrät käsittelyerää kohti (50 g)^{x)}

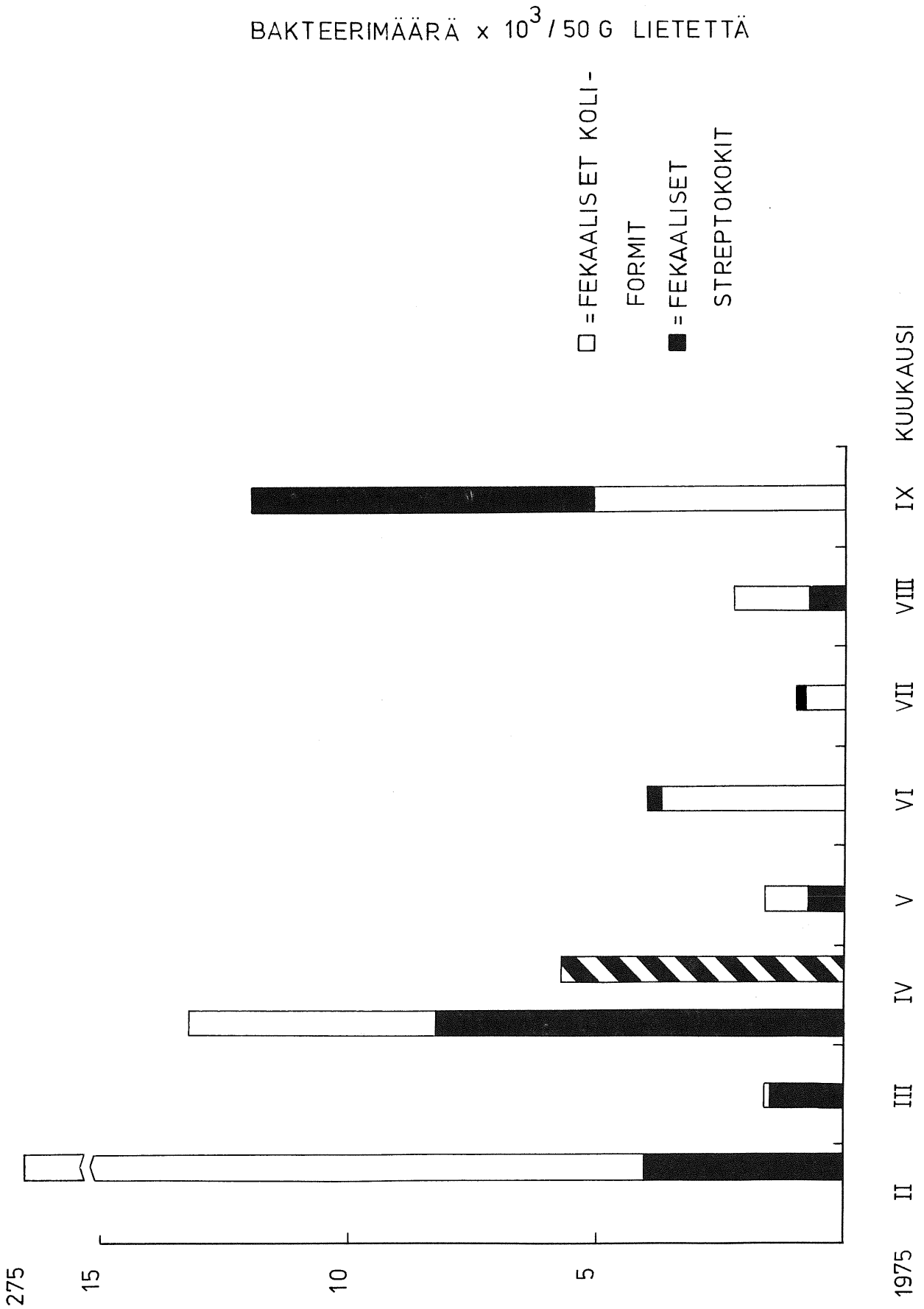
Lietenäytteen säilytyksen kesto aika (vrk)	Bakteerimäärät					
	2. ravistelun jälkeen			3. ravistelun jälkeen		
	vaihtelurajat	keski- arvo	SD	vaihtelurajat	keski- arvo	SD
0	<750-275000	≤34361	+87691	9-≥2400	≥1931	+ 822
1	<750- 95000	≤20069	+31080	43-≥2400	≥1237	+1027
7	<750-275000	≤32236	+63945	93-≥2400	≥1046	+ 932

x) Ajanjakso helmi - syyskuu 1975; MacConcey-liemi ja laimennusputkisarja; näytteiden lukumäärä N = 18.

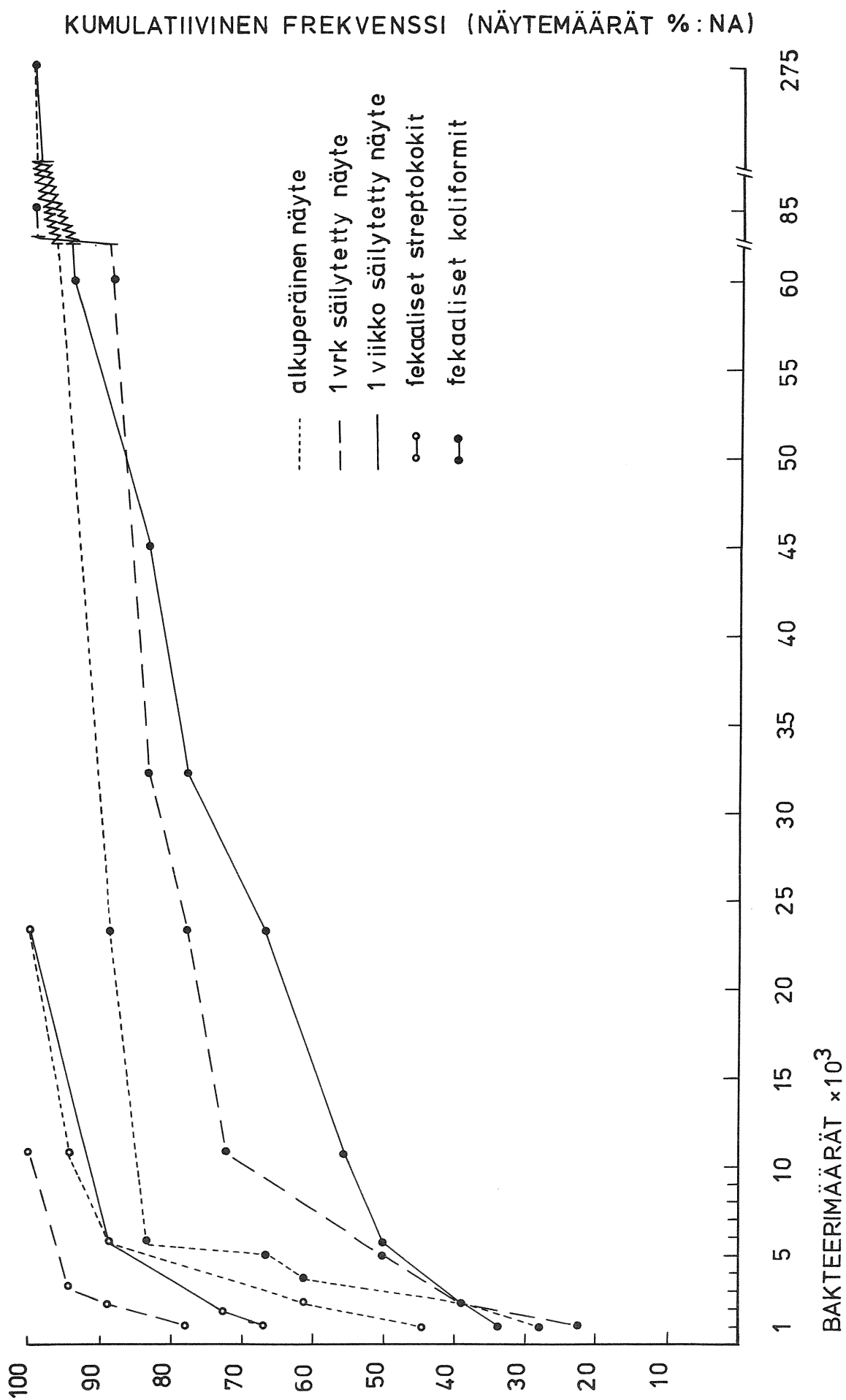
Taulukko 4. Alkuperäisestä, yksi vuorokausi ja yksi viikko säilytetyistä lietenäytteistä toisen ja kolmannen ravistelun jälkeen irronneiden fekaalisten streptokokkien määrät käsittelyerää kohti (50 g)^{x)}

Lietenäytteen säilytyksen kesto aika (vrk)	Bakteerimäärät					
	2. ravistelun jälkeen			3. ravistelun jälkeen		
	vaihtelurajat	keski- arvo	SD	vaihtelurajat	keski- arvo	SD
0	<750-23250	≤4236	+5528	<3-1100	≤309	+ 396
1	<750-10750	≤1708	+2360	<3-1100	≤231	+ 432
7	<750-23250	≤4194	+7175	<3- 240	≤ 59	+ 70

x) Ajanjakso helmi - syyskuu 1975; SF-liemi ja laimennusputkisarja; näytteiden lukumäärä N = 18.



Piirros 3. Fekaalisten koliformien ja streptokokkien lukumäärä 50 grammassa lietenäytettä eri kuukausina.



Piirros 4. Kalkkilietteestä 2. ravistelukerralla (B) irronneiden bakteerimäärien vaihtelut.

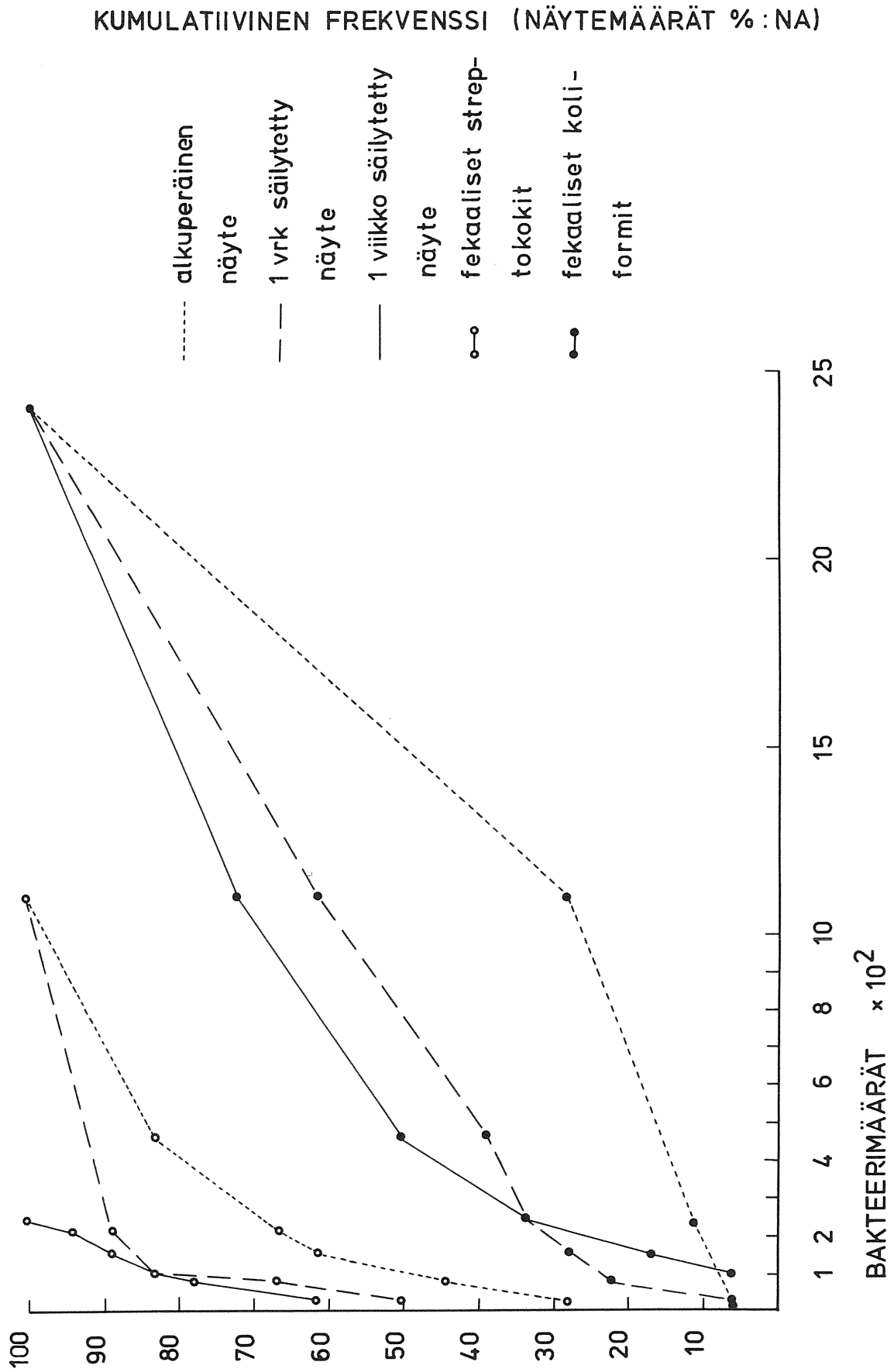
Fekaalisten streptokokkien määrien voidaan katsoa vähentyneen selvemmin säilytyksen aikana kuin fekaalisten koliformien. Piirros 5 vaiheesta C tukee edellistä. Siitä havaitaan myös, että vähäisempien lähtötiheyksien ollessa kyseessä säilytyksen vaikutus ilmenee selvemmin.

Taulukossa 5 (vaihe B) ryhmästä FC/FS>4,0 on myös todettavissa, että streptokokkien määrä vähenee säilytyksen aikana, mutta 1 vrk tai 1 viikon säilytyksellä ei ole eroa käytettäessä suhdeluokkaa vertailuperusteena. Muiden ryhmien, 0,7 - 4,0 ja <0,7, tulokset tukevat edellistä. Taulukko 6 (vaihe C) kuvaa tilannetta, jolloin ko. bakteeriryhmien alkuperäiset tiheydet ovat vähäisiä. Tällöin korkean FC/FS-suhteen näytteiden osuus lisääntyy säilytyksen kuluessa.

3) Kalkkilietesuspension pH tutkimuskauden aikana

pH-arvojen jakaantuminen tutkituissa 50 näytteessä ilmenee seuraavasta asetelmasta:

pH-arvo	% näytteistä	ryhmitys
10,9	4	26 % pH 10,5 - 10,9
10,8	4	
10,7	6	
10,6	6	
10,5	6	
10,4	22	54 % pH 10,3 - 10,4
10,3	32	
10,2	6	20 % pH \leq 10,2
10,1	4	
10,0	6	
9,9 - 9,5	-	
9,4	2	
9,3 - 9,2	-	
9,1	2	



Piirros 5. Kalkkilietteestä 3. ravistelukerralla (C) irromneiden bakteerimäärien vaihtelut.

Taulukko 5. Fekaalisten koliformien jakaantuminen alkuperäisessä, yhden vuorokauden ja yhden viikon säilytetyissä lietenäytteissä suhteessa fekaalisiin streptokokkeihin (FC/FS) toisen ravistelun jälkeen (B).

Lietenäytteen säilytyksen kesto aika (vrk)	FC/FS>4,0			FC/FS = 0,7 - 4,0			FC/FS<0,7		
	Näytteiden lukumäärä	%	Fekaalisten koliformien vaiht.väli	Näytteiden lukumäärä	%	Fekaalisten koliformien vaiht.väli	Näytteiden lukumäärä	%	Fekaalisten koliformien vaiht.väli
0	4	22,2	3750-275000	11	61,1	<750-23250	3	16,7	3250-5250
1	9	50,0	5000-95000	8	44,4	<750-10750	1	5,6	1000
7	9	50,0	5250-275000	9	50,0	<750-32500	0	0	0

Taulukko 6. Fekaalisten koliformien jakaantuminen alkuperäisessä, yhden vuorokauden ja yhden viikon säilytyksessä lietenäytteissä suhteessa fekaalisiin streptokokkeihin (FC/FS) kolmannen ravistelun jälkeen (C).

Lietenäytteen säilytyksen kesto aika (vrk)	FC/FS>4,0			FC/FS=0,7 - 4,0			FC/FS<0,7		
	Näytteiden lukumäärä	%	Fekaalisten koliformien vaiht.väli	Näytteiden lukumäärä	%	Fekaalisten koliformien vaiht. väli	Näytteiden lukumäärä	%	Fekaalisten koliformien vaiht. väli
0	13	72,2	1100->2400	3	16,7	1100->2400	2	11,1	9-240
1	14	77,8	23->2400	4	22,2	75->2400	0	0	0
7	15	83,3	93->2400	3	16,7	150-460	0	0	0

1.3.4 Puhdistamattoman jäteveden Salmonella-tutkimuksia

a) Tutkimusajanjakso on kestänyt heinäkuusta 1974 syyskuuhun 1975 loppuun.

Näytteiden lukumäärä (kaavio 3, näytteenottokohde 1, s. 40) on ollut 11 näytettä á 2 litraa. Konsentroidi on suoritettu piimaahan, s. 6.

Tuloksista:

- Heinäkuussa 1974 todettiin serotyyppit S. enteritidis ja S. montevideo. Syyskuussa 1975 todettiin S. typhimurium kaksi eri kertaa.
- Positiivisten näytteiden osuus oli 36 % tutkituista tutkittaessa 2 l:n näytettä.

b) Oulun kaupungin elintarvikelaboratorio on suorittanut tutkimuskauden aikana yhteensä 43 jätevesinäytteen salmonellatutkimuksen (Oksanen 1976).

Tuloksista:

- Lokakuussa 1974 todettiin serotyyppi S. oranienburg ja marraskuussa 1974 S. enteritidis. Vuoden 1975 aikana otetuissa 27 näytteessä ei todettu salmonelloja.
- Positiivisten näytteiden osuus oli 4,7 % näytteistä tutkittaessa vähintään 100 ml näytettä.

1.4 Tulosten tarkastelu

Jätevesilietteen mikrobiston tutkimuksiin vaikuttavat lukuiset tekijät, joiden vuorovaikutus on yhä monipuolisempi silloin, kun kyseessä on ns. kalkkistabiloitu liete, johon on jäteveden käsittelyvaiheessa lisätty anionista polyelektrolyyttiä. Vuorovaikutus muodostuu biologisista, kemiallisista ja fysikaalisista tekijöistä. Kirjallisuudessa on esitetty ainakin seuraavien ympäristötekijöiden voivan vaikuttaa koliformien säilymiseen elävinä: liuenneet ravinteet, orgaaninen aines, antibiootit, bakteerisolujen hajoaminen

(lyysis), raskaat metallit, bakteerien välinen kilpailu ravinteista, alkueläinten toiminta, eri alkuperää olevat toksiininit, vuodenaikaiset vaihtelut, bakterisidiset tekijät, lämpötila sekä ympäristön fysikaalis-kemiallinen luonne (Faust et al. 1975).

Butler ja Ludovici (1969) esittävät jätevedeen joutuneiden salmonellojen eloonjäämiseen vaikuttavan rasvojen, detergenttien, saippuoiden ja teollisten jätevesien. Vuorovaikutukset voivat olla hyvin erilaisia, ja on myös esitetty, että bakteriofagit inhiboivat salmonelloja ja estävät suolisto-organismien eristämisen.

Kalkkistabiloidussa lietteessä lietteen pH-taso vaikuttaa kuitenkin ratkaisevimmin bakteeriston säilymiseen. Tällöin on syytä korostaa lietteen homogeenisuuden merkitystä pH:n suhteen. Doyle (1967) on osoittanut, että Salmonella typhosan eloonjääminen vähenee pH-tasoa nostettaessa siten, että pH:n ollessa 11,0 tai korkeampi ei tätä organismia voida osoittaa 24 tunnin säilytyksen jälkeen. Kuitenkin useissa lietenäytteissä havaittiin pH-arvon laskevan 24 tunnin aikana jopa 12,4:stä arvoon 9,7. Oulun jätevedenpuhdistamon kalkkilietesuspension pH-arvot vaihtelivat 10,9 - 9,1, kun mittaus suoritettiin keskimäärin 2 tunnin kuluttua näytteenotosta ja suspensio-teenä oli fysiologinen suolaliuos. 20 % näytteistä oli tällöin pH-alueella 10,2 - 9,1. Doylen mukaan pH:n vaihtelu mitattuna lietteen vesisuspensiosta, lietekakusta tai sen suodoksesta on $\pm 0,15$ pH-yksikköä.

Lietteen pH:n muutokset tulevat erityisesti esille lietettä varastoitaessa, mikä käy ilmi asetelmasta s. 24. Yhden vuoden ja kahden kuukauden kuluessa pH-taso oli muuttunut 10,3:sta 8,7:ään. Eri kerroilla otettiin 2 - 6 rinnakkaista näytettä, joiden pH-arvoissa saattoi myös olla 1,4 pH-yksikön ero mitattuna suspensiosta, jossa oli 50 g lietettä ja 100 ml nestettä (koekerta 12.11.1974).

Ruotsissa suoritettussa laboratoriotutkimuksessa (Naturvårdsverkets årsbok 1973) on tutkittu toisaalta korkean pH:n vaikutusta biologisesti puhdistettuun jätevedeen ja toisaalta sekoittamalla tunnettujen bakteerien viljelmiä kalkkiliuokseen eri pH-arvoissa (pH 11 - 12). Tällöin on voitu osoittaa, että bakteerit vähenevät neljässä

tunnissa jopa käytännöllisesti katsoen täydellisesti pH 11,5:ssä. Kuitenkaan nämä tutkimusolosuhteet eivät vastaa olosuhteita kalkkilietteessä, jossa k.a.pitoisuus on 22 % ja organismit useanlaisen materiaalin suojaamina.

Lietteen mikrobit ovat adsorboituneet ja sedimentoituneet hiekka-hiukkasiin ja niitä suojaa erilainen orgaaninen materiaali. Tämän vuoksi niitä on vaikea saada irrotetuksi ja kasvamaan elatusalustoilla. Maljaviljelyissä suoraan lietteestä voitiin havaita siirrostuskohdalla selviä inhibitioalueita. Toisaalta on myös esitetty, että mahdollisesti vesistön pohjamudan savi ym. vastaava materiaali vaikuttavat bakteerien määrittämisessä käytettyyn rikastusliemeen poistaen välttämättömiä ioneja ja ravinteita (Donsel & Geldreich 1971).

Seurauksena on, että saman näytteenottokerran alanäytteissä on selviä bakteeritiheyksien eroja. Tämä käy selvimmän ilmi salmonellakoesarjojen 1, 2 ja 3 tuloksista, jolloin samasta näytevaiheesta saadaan positiivinen tai negatiivinen tulos. Kolmannen koesarjan viimeisen koekerran salmonella-tiheystulokset, 0 ja >16 osoittavat, että tutkimusmateriaalin epähomogeenisuus on otettava huomioon ja tutkittavia alanäytteitä on oltava riittävästi näytteenottoa suunniteltaessa. Koesarjojen 1 ja 2 tulokset osoittavat, että näyterän huolellinen homogenointi on tarpeen ja menetelmä on tarkoin määriteltävä myös käsittelyn tältä osin.

Aikaisemmin on esitetty tuloksia, joissa organismien lukumäärä alenee nopeasti pH 11,5:ssä (Kavonius 1974). Tässä työssä pyrittiin myös selvittämään, miten lietteen biologinen aktiivisuus muuttuu säilytyksen aikana, kun aktiivisuuden indikaattoreina ovat fekaaliset koliformit ja fekaaliset streptokokit. Voitiin osoittaa, ettei säilytys vaikuttanut organismien määrän tasoon, sillä erot rinnakkaisissa näytteissä olivat samaa suuruusluokkaa kuin alkuperäisen ja 7 vrk:n säilytyksen jälkeisen näytteen. Säilytyksellä voisi sijaan olla toksisia ja inhibitorisia tekijöitä vähentävä vaikutus.

Tässä pyrittiin löytämään sopivat indikaattoriorganismit lietteen biologisen aktiivisuuden seuraamiseksi. Siinä käytettiin hyväksi fekaalisten koliformien ja fekaalisten streptokokkien välistä suhdetta. Suhteen tulisi olla yli neljän, mikä osoittaisi humaani-alkuperää (Geldreich et al. 1964). Kolmas ravistelukerta antaa tulokseksi lähinnä oikean suhteen ko. organismeja; 72,2 - 83,3 % näytteistä omasi em. suhteen. Toisen ravistelukerran näytteistä vastaavasti vain 22,2 - 50 %. Fekaaliset koliformit irtoavat vaikeammin suspensiosta. Fekaaliset streptokokit puolestaan vähenevät selvemmin säilytyksen aikana. Donselin ja Geldreichin (1971) suorittamat pohjamutatutkimukset osoittavat, että fekaaliset koliformit vähenevät nopeammin kuin fekaaliset streptokokit. McFeters työtovereineen (1974) ovat osoittaneet koliformien kuolevan vain vähän nopeammin kuin fekaalisten streptokokkien tutkittaessa käsittelemätöntä jätevettä.

Kentälle varastoidun lietteen bakteriologiset tulokset on saatu yhden vuoden ja kahden kuukauden aikana, jolloin on tutkittu 12 näytettä. Kylmä varastointikausi on säilyttänyt bakteerit elävinä, koska niiden metabolia on inaktivoitunut. Mielenkiintoista on havaita rinnakkaisnäytteiden indikaattoriorganismien määrien vaihtelevan yhtä suuresti koeajan alussa ja lopussa. Tässä liete-erässä ei liioin ole voitu osoittaa salmonelloja 600 g:aa kohti lietettä.

Oloissamme voidaan pitää Salmonella-suvun organismeja tärkeimpinä veden välityksellä leviävien tautien aiheuttajista. Clark & Brown (1973) ovat esittäneet, ettei elintarvike- ja sairaalakäyttöön kehitettyjä menetelmiä tulisi käyttää osoitettaessa suolistopatogeeniä vedestä. Olisi kiinnitettävä erityistä huomiota aerobisen kasvuston estämiseen, ja käytetty selektiivinen elatusaine ei saisi vaurioittaa näitä bakteerisoluja silloin, kun niitä tutkitaan vesinäytteistä. Myös Carney työtovereineen (1975) on kiinnittänyt huomiota elatusaineen koostumukseen, jotta se suojaisi paremmin vesialkuperää olevia enteropatogeenisiä bakteereja. Salmonellatutkimuksissa on käytetty klinisen laboratorion rutiinimenetelmää muunnettuna siten, että kasvatuslämpötila oli 41,5 °C ja viljelyt S-S-alustoille suoritettiin sekä 1 vrk:n että 2 vrk:n rikastamis-

vaiheen jälkeen. Tiedossa on, että vesimiljööseen joutuneiden enterobakteerien generaatioaika on pitempi kuin kliinisisissä näytteissä.

Alkuperäisen lietteen osoitettiin sisältävän aineosia, jotka esittävät organismien kasvun maljalla. Sen vuoksi kehitettiin menetelmä, jossa suspensoitu liete homogenoitiin huolella ja organismit suodatettiin selkeyttämisen jälkeen piimaahan. Tällöin saatiin pääosa toksisista aineista eliminoiduksi. Laskeutunut osa käytettiin lietteen biologisen aktiivisuuden seuraamiseen. Näytesarja tutkittiin heti näytteenottopäivänä, 1 vrk:n ja 1 viikon säilytyksen jälkeen. Keinotekoisesti infektoidut näytteet osoittivat, että Salmonella typhimurium säilyy elävänä 17 °C:n lämpötilassa ainakin 12 viikkoa, mutta kuitenkin 7 viikon säilytyksen jälkeen positivistien tulosten määrä näytesarjassa väheni. Piirros 1 osoittaa, että sekä näytteenotto että menetelmä ovat keskeisiä positiivisia tuloksia tulkittaessa. Tässä käytettyä menetelmää ei ole kuitenkaan testattu siten, että olisi tiedossa sen herkkyyssraja, sillä keinotekoisessa infektoinnissa on käytetty runsasta salmonellasiirrosta.

Vastaava solumäärä voi tuskin joutua käytännön olosuhteissa prosessoitavaan jäteveeteen. Butler & Ludovici (1969) ovat myös osoittaneet, ettei jätevedestä voida osoittaa siihen lisättyjä salmonelloja, jos S. typhimurium -määrä on 50 organismia ja suhde jäteveden alkuperäiseen bakteeristoon on 1:500 00. Jos suhde oli 1:50 000, saatiin isolaatioindeksiksi 17 %. Tämän tuloksen perusteella olisi erityisesti kehitettävä kasvuolosuhteita, jotka suosisivat enteropatogeeneja ja estäisivät muiden organismien runsaan kasvun.

Kirjallisuudessa on tietoja, että salmonellat kuolevat säilytettäessä nopeammin kuin koliformit ja fekaaliset streptokokit. Kuitenkin tiedetään eri Salmonella-lajien välillä sekä eri serotyyppien välillä olevan eroja (Rinne 1970). Välittömästi näytteenoton jälkeen tutkituista lietenäytteistä ei voitu tässä kehitetyllä metodiikalla osoittaa salmonellaorganismeja, vaikka seleniittiliemirikastusten määrä oli lähes 400 koekauden aikana ja vaikka varsinaisen tutkimus-

kohteen, piimaakakku A:n ulkopuolelle jäävät sedimentit B, C ja D tarkastettiin suoralla viljelyllä S-S-maljalle. Tulos voitaisiin ilmoittaa myös siten, ettei salmonelloja ollut osoitettavissa 2 700 g kohti tutkittua lietettä.

Salmonellariskiä on pyritty ennustamaan siten, että on määritetty se suolistoperäisten indikaattoriorganismien määrä, jolloin myös on voitu osoittaa salmonelloja. Tällaiset vertailut ovat suhteellisen harvinaisia, koska ko. organismien kvantitatiiviset isolaatiot ovat rajoitettuja. Donsel & Geldreich (1971) ovat esittäneet salmonellojen ja fekaalisten koliformien numeerisen suhteen siten, että pohjamudan salmonellojen suhde fekaalisiin koliformeihin olisi 1: 14 000. Dunlop työtovereineen (1952) on määrittänyt vastaaviksi tiheyksiksi virkistyskäytössä olevissa vesissä seuraavaa: yhtä salmonellaa kohti koliformien kokonaismäärä 255 000 ja enterokokkien määrä 48 000. Tällöinkin todettiin alhaisten salmonella-arvojen johtuvan metodologian rajoituksista.

Olisi mielenkiintoista ja tärkeää määrittää se ihmisten minimipopulaatiotiheys yhdyskunnassa, josta olisi osoitettavissa jäteveden käsittelyn yhteydessä salmonellat. Tätä seikkaa pyrittiin vähältä osin kartoittamaan tässä työssä jätevedenpuhdistamoon tulevan jäteveden salmonellatutkimuksilla. Salmonelloja voitiin osoittaa harvoin - tutkittaessa kahden litran näyte 36 %:ssa näytteitä ja tutkittaessa vähintään 100 ml kerralla vain 4,7 %:ssa näytteitä. Todennäköistä on, että menetelmän yksityiskohdissa on kehittämisen aihetta sekä että tutkitut näytemäärät eivät olleet riittäviä vähäisen salmonellapitoisuuden osoittamiseen. Tällä hetkellä on kehitetty luonnonvesien tutkimiseen menetelmiä, joissa voidaan tutkia jopa 189 litran vesinäyte (Dutka & Bell 1973). Myös fluoresoivaa vasta-ainetta (FA-tekniikka) on käytetty menestyksellisesti veden indikaattoriorganismien sekä salmonellojen osoittamisessa (mm. Ginsburg et al. 1972, Insalata et al. 1973). Tutkimusohjelmamme puitteissa ei tässä työssä voitu menetelmää kokeilla, vaikka se kuuluu eräissä muissa yhteyksissä rutiinityöskentelyn piiriin.

Kuitenkin jo tässä työssä saatujen tulosten ja tietojen perusteella

on pidettävä hyvin todennäköisenä, ettei kalkkilietteellä ole salmonellapitoisuuden suhteen terveydellistä riskiä, jos sitä käytetään tarkoin suunniteltujen ohjeiden mukaisesti maanparannusaineena. Kuitenkin tämä edellyttää riittävää kalkkistabilointia ja lietteen mahdollisimman hyvää sekoittamista, homogeenisuutta. Lisäksi on edellytettävä, että ollaan tietoisia jätevedenpuhdistamoon tulevan veden salmonellatasosta ja että lietteen laaduntarkkailu suoritetaan ottaen huomioon eri tekijöiden vuorovaikutus.

2. VIRUKSIA KÄSITTELEVÄ TUTKIMUKSEN OSA

2.1 Tutkimusmenetelmien esikokeiden tiivistelmä

Esikokeilla pyrittiin löytämään sopiva menetelmä virusten eristämiseksi sekä jätevedestä että lietteestä. Menetelmän löytämisen vaikeutena oli, että kaksi tutkittavaa aineryhmää, vesi ja 22 % kuiva-ainetta sisältävä liete, ovat laadultaan erilaiset.

Menetelminä kokeiltiin kloroformikäsittelyä, filtraatiomenetelmää, ultrasentrifugaatiokonsentraatiota sekä mahdollisimman suuren näyttemäärän inokulointia laajalle kasvualustalle. Erilaisten antibioottien sekä niiden määrien kokeileminen oli välttämätöntä näytteissä esiintyvien, maaperästä lähtöisin olevien, monesti resistenttien sienten ja bakteereiden eliminoimiseksi. Tutkittiin myös miten jotkin enterovirukset pysyvät elävinä koeolosuhteissa korkean pH:n omaavassa lietteessä.

2.2 Materiaali ja menetelmät

2.2.1 Näytteiden otto ja viljely

Viruksia käsittelevä tutkimuksen osa suoritettiin aikana helmijoulukuu 1975. Näytteitä otettiin 2 - 5 kertaa kuukaudessa.

Näytteet otettiin jätevedenpuhdistamosta seuraavasti:

tuleva vesi suoraan puhdistamoon tulevasta viemäristä (kaavio 3, s. 40, näytteenottokohde 1), kokoomavesi kaavion 3 mukaan (näytteenottokohde 2), lähtevä vesi poistoputkesta (kaavio 3, näytteenottokohde 4) sekä jäteliete kuljetushihnalta (kaavio 3, näytteenottokohde 3).

Viruseristykseen käytetyt solukannat olivat heteroploidisen apinan munuaisesta peräisin olevat BS-C 1, VERO ja GMK sekä diploidinen HEF (Human embryo fibroplast). Kaikissa näissä solukannoissa käytettiin elatusaineena Minimum Essential Mediumia (MEM) ja 2 % fetaalivasikan seerumia (FCS). Kaikkia solukantoja ei aina voitu

käyttää yhtä aikaa, mutta jokaista näytettä kohti käytettiin vähintään kahta eri kantaa. Soluviljelyksen antibiootit olivat normaalisti G-Penicillin 100 IU/ml, Streptomycin 50 µg/ml ja Nystatin 50 µg/ml. Mikäli näytteissä oli esikäsittelyn jälkeen vielä näille antibiooteille resistenttejä bakteereja tai sieniä, käytettiin Gentamicin 300 µg/ml, Tetracyclin 10 µg/ml, Kanamycin 100 µg/ml ja Actioion 0,5 µg/ml. Enteroviruskontrolleina virusten ajallisen säilymisen osoittamiseksi jätelietyt näytteet infektoitiin keinotekoisesti Coxsackie B₅- ja Reoviruksilla (kannat saatu Helsingin yliopiston virusopin laitokselta), säilytyslämpötila (virus + liete) oli 4 °C. Lietteen sisältämä virusmäärä TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose) sekä sen säilyvyys lietteessä tutkittiin GMK-soluilla kuoppalevytekniikan avulla (Falcon Plastic). Tutkitut alkuperäisnäytteet säilytettiin -70 °C:ssa mahdollista uudelleen käsittelyä varten.

2.2.2 Näytteiden esikäsittely

Lietteen esikäsittely: 25 g lietettä suspendoitiin 0,9 % NaCl tai 0,7 % Teepooliin 50 ml:ksi, neutraloitiin 1,0 N HCl:llä, ravisteltiin lasihelmien kanssa 60 min 4 °C.

Jätevesi sentrifugoitiin suoraan 2 500 rpm 4 °C 30 min virusta suurempien partikkeleiden erottamiseksi.

2.2.3 Virusten eristysmenetelmät

Bakteereiden ja sienten poisto sekä virusten eristys suoritettiin seuraavasti:

I Kloroformikäsittely: Esikäsiteltyä lietettä sekä jätevettä ravisteltiin kloroformin kanssa 30 min 4 °C (1/5 kloroformia). Näytteet sedimentoitiin 30 min 4 °C. Pintaneste sentrifugoitiin 2 500 rpm/30 min 4 °C partikkeleiden erottamiseksi. Kirkas neste inokuloitiin elatusalustoille (kudosviljelyputki 0,1 ml, Falcon-pullo 0,2 ml).

II Konsentraatiomenetelmä: Kloroformilla käsiteltyä näytettä (kohta I) sentrifugoitiin 39 000 rpm 3 h 4 °C. Pohjalle erottunut sakka

sekoitettiin kahdeksi ml:ksi elatusaineeseen. Inokulointi elatusalustalle (kudosviljelyputki 0,1 ml, Falcon-pullo 0,2 ml).

III Filtraatiomenetelmä: Esikäsitelty näyte (ei kloroformikäsitelty) suodatettiin Millipore-filtterin läpi (Millex SLGS 025 OS, 0,22 μ m). Suodos inokuloitiin elatusalustalle (kudosviljelyputki 0,1 ml, Falcon-putki 0,2 ml).

IV Laajapintaaisille elatusalustoille inokulointi: Esikäsiteltyyn lietteeseen sekä jäteveteen lisättiin normaalisti kudosviljelyssä käytettäviin antibiootteihin nähden 100 - 1000-kertaiset määrät antibiootteja (Gentamicin 600 μ g/ml, Tetracyclin 200 μ g/ml ja Ny-statin 1000 IU/ml). Näytteitä ravisteltiin yli yön 4 °C ja ne inokuloitiin suoraan elatusalustalle (iso kudosviljelypullo, kasvupinta-ala n. 150 cm², 1 ml).

V Kontrolli: Autoklavoituun, esikäsiteltyyn sekä esikäsittelemättömään lietteeseen lisättiin 100 - 1000-kertaiset määrät antibiootteja (kohta IV) sekä Cocksackie B₅- tai Reovirusta. 18 h:n ravistelun jälkeen 4 °C lietenäytteet inokuloitiin elatusalustalle (kuoppalevy) eri aikaväleihin. Viruskonsentraatio oli Cocksackie B₅-virukselle 1000 TCID ja Reovirukselle 100 TCID. Filtraatiomenetelmän kontrollina käytettiin Reovirusta, joka suodatettiin käsittelemättömän jäteveden kanssa Millipore-filtterin läpi.

2.3 Tulokset

Liete- ja jätevesinäytteistä tehtiin n. 400 virusviljelyä. Ainoastaan kahdesta näytteestä, jotka oli otettu puhdistamolle tulevasta jätevedestä, pystyttiin eristämään enterovirus (näytteet otettu 1.9. ja 1.12.1975). Viruksia ei tyypitetty. Jätelietteestä ei viruksia löytynyt.

Cocksackie B₅-virus säilyi elävänä lietteessä, jonka pH oli 7,5 yli 14 vrk ja lietteessä, jonka pH oli 10,5 yli 14 vrk. Reovirus säilyi pH 10,5:ssä 2 vrk. Virusten (Reovirus) ja muiden mikro-organismien erottaminen Millipore-suodatuksella osoitti, että osa viruksia saat-

taa jäädä suodattimen kuituihin.

2.4 Menetelmien ja tulosten tarkastelua

Bakteereiden sekä sienten eliminoiminen tutkittavasta materiaalista osoittautui vaikeaksi, koska antibiooteilla käsitellyissä näytteissä oli käytetyille antibiooteille resistenttejä kantoja. Nämä olivat maaperästä lähtöisin olevia mikro-organismeja (esim. Alcaligenes faecalis, Candina parapsilosis ja Geotrichum candidum). Kloroformikäsittely (I) lietteessä olevien bakteereiden eliminoimiseksi oli hyvä. Ultrasentrifugointi (II) kerää myös mahdollisesti näytteessä mukana olevat bakteerit tehokkaasti sakkaan, jolloin joukossa saattaa olla käytetyille antibiooteille resistenttejä kantoja. Millipore-suodatus (III) absorboi kuituihinsa osan näytteissä olevista viruksista. Laajapintaisten kasvualustojen käyttö (IV) suurimman mahdollisen alkuperäisnäytemäärän saamiseksi kasvualustoille oli käyttökelpoisin kokeilluista menetelmistä.

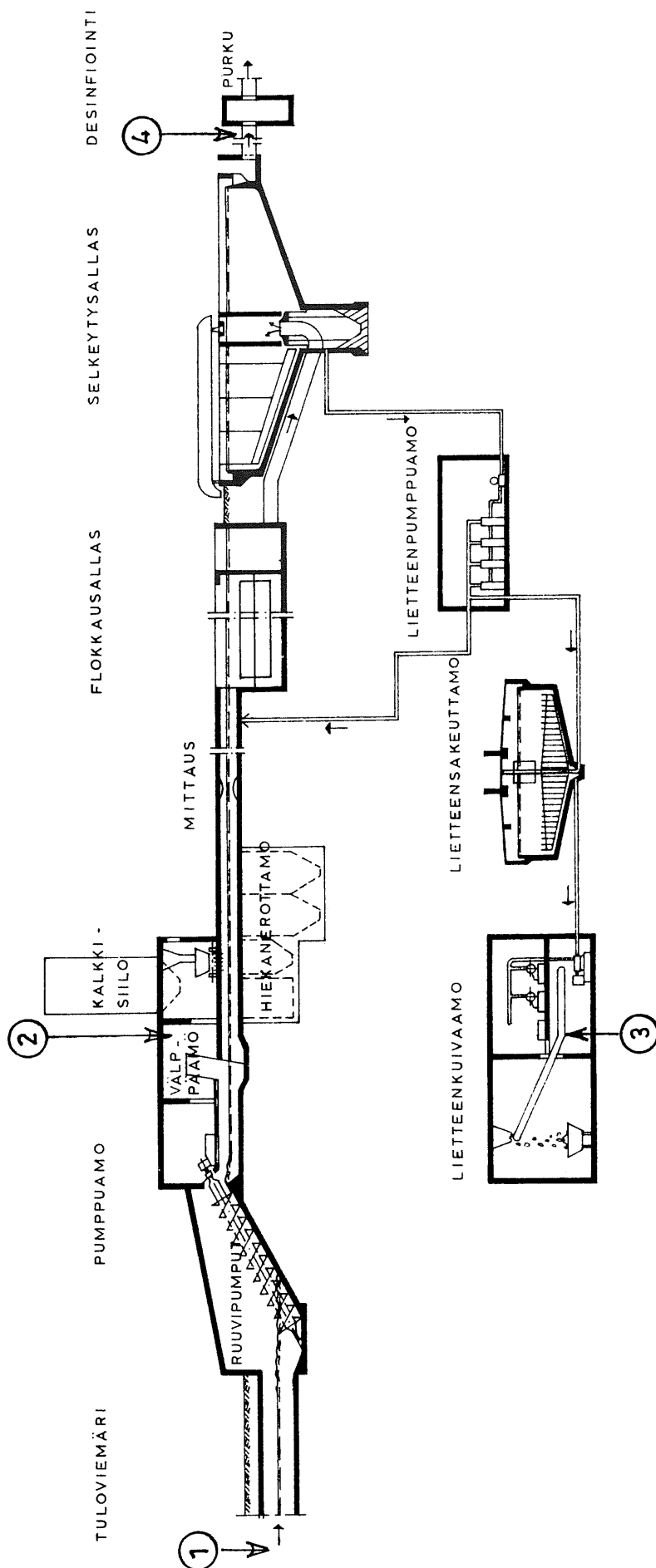
3. OULUN KAUPUNGIN JÄTEVEDENPUHDISTAMON TOIMINTAPERIAATTEET, KÄSITELTY JÄTEVESI JA LIETE

3.1 Toimintaperiaate

Jätevesien puhdistus Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamossa tapahtuu kemiallisella selkeytysmenetelmällä, jossa lika-aineet saostetaan kalsiumhydroksidilla. Tämä menetelmä vähentää tehokkaasti jäteveden fosfori- ja bakteeripitoisuuksia. Puhdistamon toimintaperiaatteesta antaa kuvan kaavio 3, johon on merkitty myös näytteenottokohteet tutkittaessa mikro-organismeja jätevedenpuhdistamon kalkkilietteestä. Vuorokaudessa puhdistettava jätevesimäärä on n. 55 000 m³. Jätevesi kulkee puhdistamossa konevälppien ja ilmastetun hiekanerottimen kautta venturikanavaa pitkin flokkausaltaisiin ja edelleen selkeytysaltaisiin. Kalsiumhydroksidi, noin 250 g/jätevesi-m³, syötetään veteen ennen flokkausaltaita. Selkeytysaltaissa liete kootaan koneellisilla kaapimilla keskellä oleviin lietetaskuihin, joista se pumpataan sakeuttamoihin sekä osa palautuslietteenä flokkausaltaiden alkupäähän. Sakeuttamoista liete pumpataan suotonauhapuristimille kuivausta varten. Kuivauksessa käytetään polyelektrolyyttiä (taulukko 7). Kuivattua lietettä kertyy vuorokaudessa n. 52 m³. Selkeytysaltaista puhdistettu jätevesi virtaa purkukaivoon ja tästä noin 1 km:n pituista purkuputkea pitkin merelle. Veden desinfiointi hypokloriitilla voidaan tarvittaessa suorittaa purkukaivossa.

3.2 Jäteveden ja lietteen laadun tarkkailu jätevedenpuhdistamossa

Vesinäytteet sekä tulevasta että lähtevästä vedestä otetaan automaattisilla näytteenottolaitteilla, jotka antavat vesimäärän mukaan painotetun keskiarvon vuorokautta kohti. Täydellisempiä vesianalyyskejä suoritetaan kaksi kertaa viikossa ja bakteriologisia määrittelyksiä kerran viikossa. Lietenäytteet otetaan kaksi kertaa viikossa pistonäytteinä flokkausaltaiden loppupäästä, selkeytysaltaista, sakeuttamosta, suotonauhapuristimelta ja ajoittain myös hiekanerotuksesta.



Näytteenottokohteet mikrobiologista tutkimusta varten:

- 1 puhdistamon jätevesi
- 2 kokoomavesi
- 3 liete hihnakuljettimen nauhalta
- 4 lähtävä vesi

Kaavio 3. Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamon virtauskaavio.

Taulukko 7. Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamon jätevesien keskimääräiset tarkkailuanalyytitulokset ja keskimääräinen puhdistusaste vuosina 1974 ja 1975.

	Tuleva jätevesi		Lähtevä jätevesi		Puhdistusaste %	
	1974	1975	1974	1975	1974	1975
pH	8,1	8,2	10,9	11,0		
lämpötila °C	10,8	11,5	9,0	11,1		
kovuus °dH	-	-	10,8	10,6		
johtokyky µS/cm	509	524	641	653		
KMnO ₄ mg/l O ₂	67	60	30	28	55	54
BHK ₇ mg/l	94	92	38	43	60	53
O ₂ mg/l	-	-	4,7	3,7		
kok. N mg/l	27,4	25,3	20,3	21,7	26	14
kok. P mg/l	8,6	7,3	1,5	1,2	83	84
kiintoaine mg/l	265	265	67	52	75	80
lask. 1/2 h ml/l	8,0	4,1	0,2	0,2		
lask. 2 h ml/l	8,6	5,0	0,3	0,3		
kolif. bakt. kpl/ml	7840	6692	21	69	99,7	99
fek. strept. kpl/ml	1208	1012	26	72	97,8	93

Tulevan ja lähtevän veden laaduntarkkailuanalyysien keskimääräiset tulokset ja puhdistusaste vuosina 1974 ja 1975 nähdään taulukosta 7. Lietteestä suoritettavat määritykset flokkausaltaassa ovat laskeutuskokeet, kiintoaine, tuhka, lieteindeksi ja pH. Tämän lisäksi määritetään selkeytysaltaasta, sakeuttamosta ja suotonauhapuristimelta otetuista lietenäytteistä tuhka- ja kuiva-ainepitoisuus. Puhdistamon kalkkilietteen keskimääräinen kuivauskapasiteetti, polymeerikulutus ja kuivaustehokkuus vuosina 1974 ja 1975 nähdään taulukosta 8.

Taulukko 8. Oulun kaupungin jätevedenpuhdistamon kalkkilietteen keskimääräinen kuivauskapasiteetti, polymeerikulutus ja kuivaustehokkuus vuosina 1974 ja 1975.

	1974	1975
<u>Lietteen kuivauskapasiteetti</u>		
m ³ /kk	3 097	3 717
m ³ /h	23,5	26,4
t/k-a./h	2,53	2,79
<u>Polymeerien kulutus</u>		
kg/kk	406	449
g/m ³	130	121
kg/t k-a.	1,20	1,18
<u>Kuivattua lietettä poistettu</u>		
m ³ /kk	1 320	1 507
<u>Lietteen kuiva-aineprosentti</u>		
tuleva liete	10,9	10,3
kuivattu liete	22,9	22,2

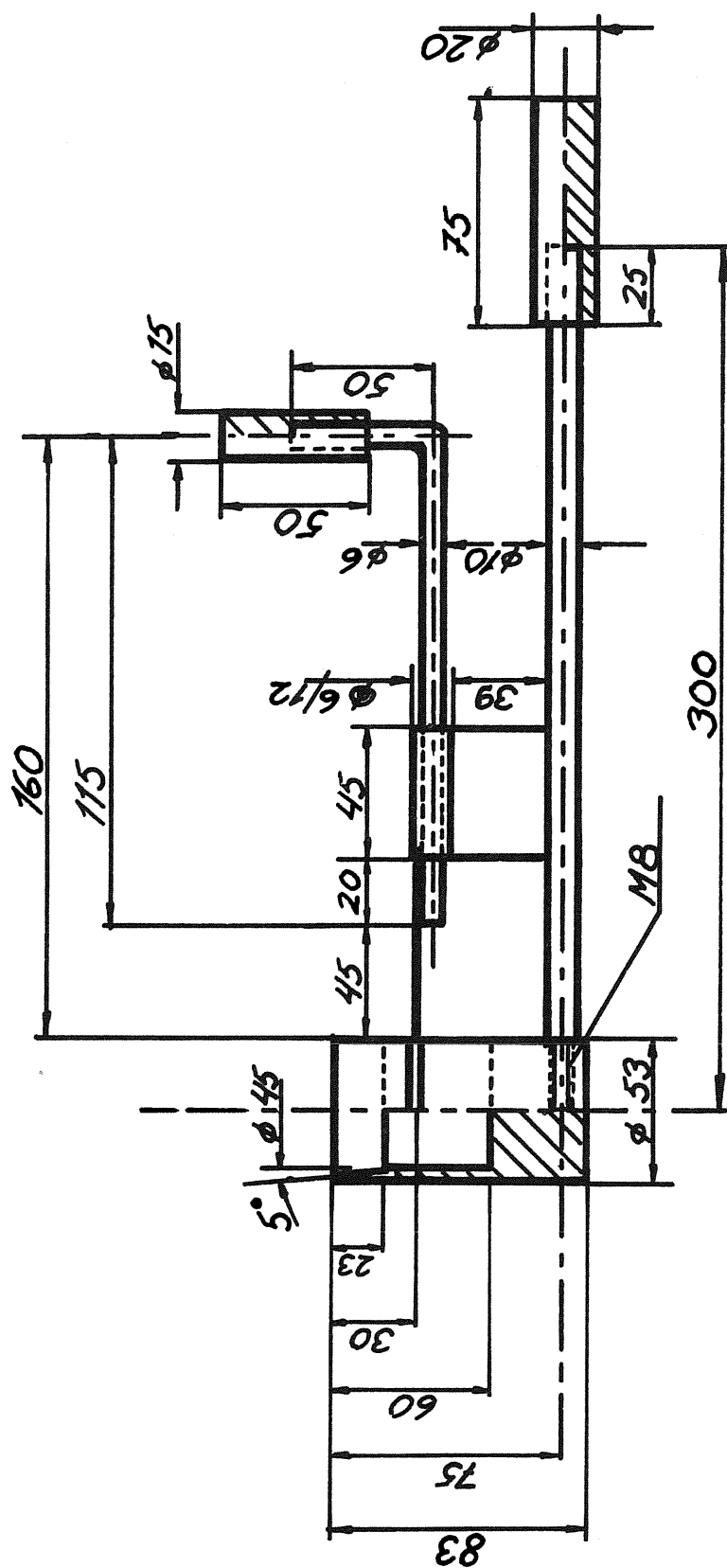
KIRJALLISUUS

- AIRAS, L., 1976: Kirjallinen tiedonanto.
- BURMAN, N.P., 1967: Recent advances in the bacteriological examination of water. Chapter 10. In Progress in microbiological techniques, s. 206 - 207. Toim. C.H. Collins. Butterworths, London.
- BUTLER, C.E. & P.P. LUDOVICI, 1969: Survival and recovery of Salmonella in Tucson's wastewater reclamation program. J. Water Pollut. Contr. Fed. 41, s. 738 - 744.
- CARNEY, J.F., C.E. CARTY & R.R. COLWELL, 1975: Seasonal occurrence and distribution of microbial indicators and pathogens in the Rhode river of Chesapeake Bay. Appl. Microb. 30, s. 771 - 780.
- CLARK, A.G. & J.R. BROWN, 1973: Detection of Salmonella and Shigella species in polluted rivers. Int. Ass. Microbiol. Soc. Abstracts Vol. II. Jerusalem, Sept. 2 - 7, 1973, s. 196.
- DONSEL, van D.J. & E.E. GELDREICH, 1971: Relationships of Salmonellae to fecal coliforms in bottom sediments. Water Research 5, s. 1079 - 1087.
- DOYLE, C.B., 1967: Effectiveness of high pH for destruction of pathogens in raw sludge filter cake. J. Water Pollut. Contr. Fed. 39, s. 1403 - 1409.
- DUNLOP, S.G., R.M. TWEDT & W.L. WANG, 1952: Quantitative estimation of Salmonella in irrigation water. Sewage Ind. Wastes 24, s. 1015 - 1020.

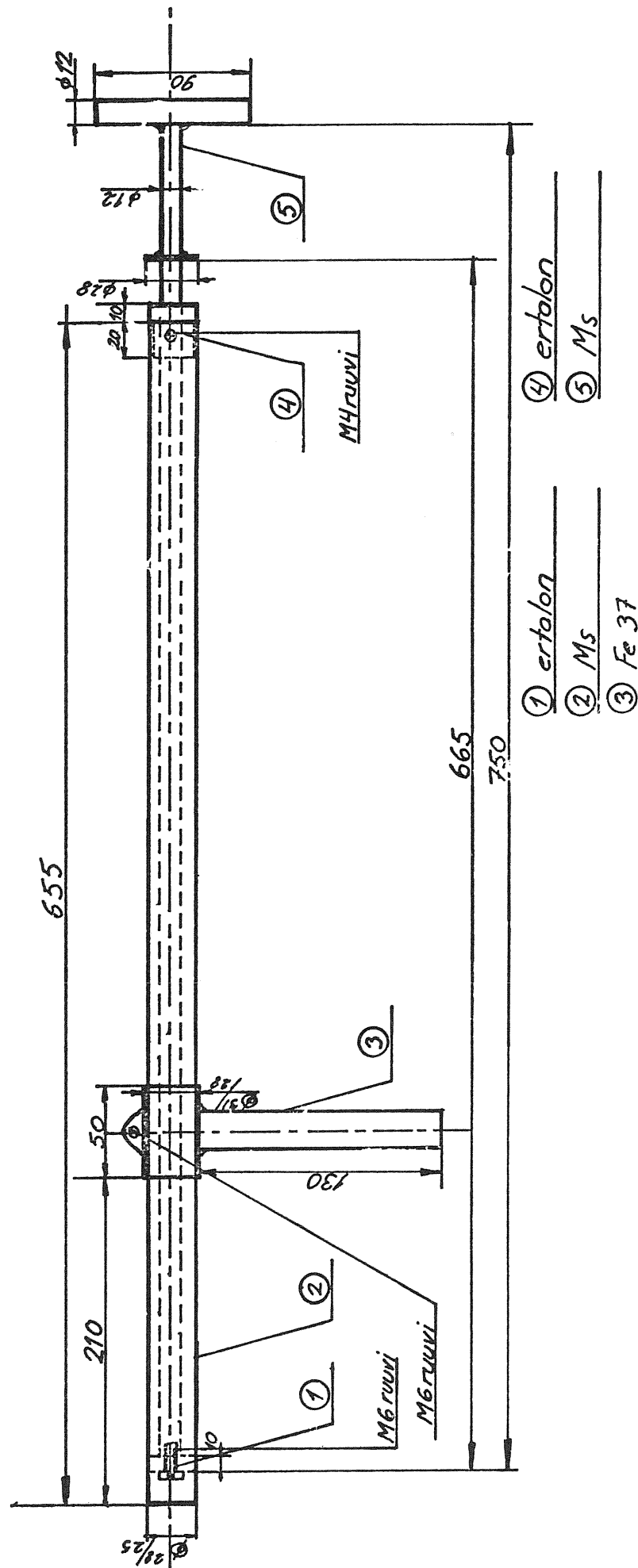
- DUTKA, B.J. & J.B. BELL, 1973: Isolation of Salmonellae from moderately polluted waters. J. Water Pollut. Contr. Fed. 45, s. 316 - 324.
- EDWARDS, P.R. & W.H. EWING, 1961: Identification of Enterobacteriaceae. Burgess Publishing Company, Minneapolis 15, Minnesota.
- FAUST, M.A., A.E. AOTAKY & M.T. HARGADON, 1975: Effect of physical parameters on the in situ survival of Escherichia coli MC-6 in an estuarine environment. Appl. Microbiol. 30, s. 800 - 806.
- McFETERS, G.A., G.K. BISSONNETTE, J.J. JEZESKI, C.A. THOMSON & D.G. STUART, 1974: Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. Appl. Microbiol. 27, s. 823 - 829.
- Forskning och undersökningsverksamhet: Effekt av kalkning på bakterier i avloppsvatten. Naturvårdsverkets årsbok 1973. Allmänna Förlaget, Lund 1974. s. 41-43.
- GELDREICH, E.E. & H.F. CLARK & C.B.A. HUFF, 1964: A study of pollution indicators in a waste stabilization pond. J. Water Pollut. Contr. Fed. 36, s. 1372 - 1379.
- GINSBURG, W., B. CRAWFORD & J.J. KNIPPER, 1972: Filter-fluorescent antibody technique for rapid screening of indicator organisms. J. Amer. Water Works. Ass. 64, s. 499 - 505.
- INSALATA, N.F., C.W. MAHNKE & W.G. DUNLOP, 1973: Direct fluorescent-antibody technique for the microbiological examination of food and environmental swab samples for Salmonellae. Appl. Microbiol. 26, s. 268 - 270.

- International standards for drinking-water. 1963. 2. p., s. 51. WHO, Geneva.
- KAVONIUS, A., 1974: Viemäri- ja sakokaivoliete ja sen käsittely. Ympäristö ja terveys 5, s. 605 - 609.
- OKSANEN, A., 1976: Kirjallinen tiedonanto.
- PARKINSON, D., F.R. GRAY & S.T. WILLIAMS, 1971: Methods of studying the ecology of soil micro-organisms. I.B.P. Handbook No. 19, Chapter 3. Sampling s. 6 - 18. Backwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh Melbourne.
- RINNE, I., 1970: Jätevesilietteiden salmonelloista I Kirjallisuuskatsaus. Vesiensuojelulaboratorion tiedonantoja 3/1970.
- SEPPÄNEN, H., 1973: Lietteen enterobakteerit: määrittämismenetelmiä. COST 68 Jaosto: Lietteen enterobakteerit. Raportti. 15 s.

NÄYTTEENNOUTAJA



NÄYTTEENOTTOLAITE



NÄYTTEENOTTOLOMAKE

Koekerta n:o VIII

pv. 10.9.74

Lämpötila ulkona 11 °C, sisällä 18 °C

Näytteenotto alkoi klo 7.30, päättyi klo 9.30

x)
xxx)
xx)

NÄYTTEET

Jätevesi: 1 + 1 litraaKalkkiliete:

näyte 1 sisältää 2 osanäytettä á 25 g

2 " " " "

3 " " " "

4 " " " "

5 " " " "

6 " " " "

alku pH	loppu pH
10,4 xxx)	7,1 xxx)
10,4	7,1
10,4	7,2
10,3	7,0
10,4	7,1
10,3	7,0

ESIKÄSITTELY JÄTEVEDENPUHDISTAMON LABORATORIOSSA

näytteet 1-2: A) liuoslisäys /n:o 1 fysiologinen suolaliuos 100 ml
/n:o 2 Teepol-liuos 100 ml

B) neutralointi 1 N H₂SO₄:llä → pH n. 7

näytteet 3-4: säilytys 1 vrk n. 10 °C, jatketaan kuten n:ot 1 ja 2
esikäsittely kuten edellä

näytteet 5-6: säilytys 1 viikko n. 10 °C, jatketaan kuten n:ot 1 ja 2
esikäsittely kuten edellä

HUOM. lasihelmet kaikkiin näytesuspensioihin,
sekoitus magneettisekoittajalla ohjeen mukaan,
näytesuspensiot saatu esikäsittelypäivinä Kansanterveys-
laboratorioon klo: 10.30 - 11.00^{xxx)}.

Näytteenottaja: _____

Näytesarjan tarkoitus: verrataan alkuperäisen, 1 vrk:n ja 1 viikon säilytettyjen näytteiden tuloksia. Samalla jatketaan kahden eri suspensionesteen käyttöä - aikaisempi sarja on osoittanut, ettei ole selvää tästä johtuvaa eroa tuloksissa.

Aikaisemmat tulokset osoittavat, että samalla näytteenottokerralla saadaan selviä indikaattoribakteerien suuruuseroja. Huom. Onko tietoja, minkä verran lietteen vesipitoisuus ja kalkkipitoisuus vaihtelevat mm. viereisissä näytteissä?

- x) näytteenotto jatkuvasti samana edustavimpana viikonpäivänä
xx) km. sama ajankohta eri näytteenottokerroilla
xxx) tehdään havainnot eri kerroilla
- näytteenottovälineistöstä tiedot aikaisemmin s. 1 ja 5.
- "tarkoitus-kappaleen" tiedot on annettu näytteenottajalle, jotta saataisiin mahdollisimman paljon molemminpuolista informaatiota
_____ (alleviivaus) täytetty jätevedenpuhdistamolla

YVY-julkaisusarja

1. Vesihuollon taloudellisuus
2. Vedenkulutuksen vaihtelut
3. Vesijohtoverkon toiminnan luotettavuus
4. Jätevedenpuhdistamojen allastilojen kattaminen
5. Ammoniakin poisto pohjavedestä
6. Teurastamojen ja lihanjalostuslaitosten jätevesikuormitus ja jätevesien käsittelymahdollisuudet
7. Maidonjalostusteollisuuden jätevesikuormitus ja jätevesien käsittelymahdollisuudet
8. Vesi- ja jätehuollon laitteiden julkinen testaus
9. Jätehuollon esimerkkisuunnitelman laatiminen keskisuurille kunnille
10. Yhdyskuntien jätehuollon nykytilanne ja tulevaisuuden näkymät
11. Menetelmä taajamien vesihuollon toteuttamisasteen ja kehityksen arvioimiseksi
12. Kaatopaikat 1974
13. Viemärlaitoksen systeemianalyysi
14. Vesihuollon edellyttämä vesistötutkimus
15. Jäteveden puhdistamojen hydraulikan ja dynamiikan tutkiminen merkkilainetekniikalla
16. Vedenjakelujärjestelmän toiminnallinen suunnittelu
17. Vedenjakelujärjestelmän simulointimalli
18. Bandsedimentator
19. Sekaviemärintiverkoston tehonlisäys ja simulointimalli suunnittelumenetelmänä
20. Haja-asutuksen viemärinti ja jätehuolto
21. Jätevesilietteen hyödyntämisen perusteet
22. Patogeenisten mikro-organismien määrittäminen kalkkilietteestä
23. Kaatopalkan valinta ja kunnossapito
24. Maaseutuyhdyskunnan jätehuolto

ISBN 951-9250-71-9
ISSN 0355-1997

KYRIIRI OY
Helsinki 1976